

**MECHANISMEN DER PROLIFERATION  
VON KARDIOMYOZYTEN DIFFERENZIERT  
AUS EMBRYONALEN STAMMZELLEN  
DER MAUS**

**MARTINA BUGGISCH**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades  
eines Dr. med. vet. beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

---

*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. E. Petzinger  
und  
dem Physiologischen Institut  
Fachbereich Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.  
Betreuer: Prof. Dr. H. Sauer**

# **Mechanismen der Proliferation von Kardiomyozyten differenziert aus embryonalen Stammzellen der Maus**

**INAUGURAL - DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

eingereicht von

**Martina Buggisch**

Tierärztin aus Groß-Gerau

Gießen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. E. Petzinger

Prof. Dr. H. Sauer

Tag der Disputation: 16.03.2007

Erklärung:

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials, sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich von folgenden Personen Unterstützung erhalten:

Professor Dr. Heinrich Sauer

Professor Dr. Ernst Petzinger

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Professor Dr. Heinrich Sauer von mir selbst ausgeführt worden.

Bad Grönenbach, den 14.12.2006



## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungen.....	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Stammzellen.....	1
1.2 Kardiomyozyten.....	4
1.3 Zellzyklus.....	7
1.4 kardiale Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktoren.....	9
1.5 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS).....	10
1.5.1 NADPH-Oxidase.....	14
1.5.2 ROS im kardiovaskulären System.....	17
2 Zielsetzung der Arbeit.....	19
3 Material.....	20
3.1 Firmen.....	20
3.2 Geräte und Laborbedarf.....	21
3.3 Medien und Chemikalien.....	22
3.4 Antikörper.....	24
3.5 Primer.....	25
3.6 Medien, Puffer.....	26
3.6.1 Medien.....	26
3.6.2 Puffer.....	27
3.6.3 Substanzen.....	28
4 Methoden.....	29
4.1 Zellkultur embryonaler Stammzellen.....	29
4.1.1 Feeder-Zellen.....	29
4.1.2 Stammzellen.....	30
4.2 Gewinnung der Kardiomyozyten.....	32
4.2.1 Isolation embryonaler Kardiomyozyten aus Stammzellen:.....	32
4.2.2 Isolation neonataler Kardiomyozyten:.....	32
4.3 Behandlung der Zellen mit verschiedenen Substanzen.....	33
4.4 Immunzytochemische Färbungen.....	33
4.5 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).....	35



---

4.6	Konfokale Lasermikroskopie .....	35
4.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	38
4.7.1	Isolation der RNA .....	38
4.7.2	cDNA-Synthese.....	39
4.7.3	Quantitative PCR.....	40
4.8	Durchflusszytometrie .....	41
4.9	Statistik.....	42
5	Ergebnisse .....	43
5.1	Isolation neonataler Kardiomyozyten .....	43
5.2	Proliferationsfähigkeit der Kardiomyozyten .....	45
5.3	Konzentrationsbestimmung des H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	51
5.4	Inkubationszeit mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	53
5.5	Stimulation der Proliferation von Kardiomyozyten durch ROS .....	54
5.6	Einfluss der Behandlung mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf die Expression der NADPH-Oxidase .....	60
5.7	Stimulation der Kardiomyogenese durch ROS .....	64
5.8	Untersuchung der Kardiomyozytenproliferation durch FACS-Analyse und mikroskopische Bestimmung .....	65
5.9	Untersuchung herzspezifischer Gene .....	68
5.10	Redoxregulation herzspezifischer Transkriptionsfaktoren und des Wachstumsfaktors BMP-10 .....	69
6	Diskussion .....	73
7	Zusammenfassung .....	82
8	Summary .....	83
9	Literaturübersicht .....	84
	Danksagung .....	103

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A. bidest	zweifach destilliertes Wasser
Ang II	Angiotensin II
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
AP-1	Aktivator-Protein 1 (activating protein 1)
BACT	$\beta$ -Aktin
BMP	bone morphogenetic protein
BrdU	Bromodesoxy-Uridin
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	ionisiertes Kalzium
$\alpha$ -CA	$\alpha$ -kardiales Aktin ( $\alpha$ -cardiac actin)
CDK	Zyclin-abhängige Kinasen (cyclin dependent kinase)
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cy 3	Indocarbocyanin
Cy 5	Indodicarbocyanin
DCF	2'-7'-Dichlorofluorescein
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPI	Diphenylen Iodonium Chlorid
EB	Embryonalkörperchen (embryoid bodies)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
ES Zellen	embryonale Stammzellen
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting)
FBS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G0	gap 0 = Quieszenz (Ruhephase)
G1	gap 1
G2	gap 2
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
h	Stunden
H <sup>+</sup>	Wasserstoff
H <sub>2</sub> DCF-DA	2'-7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diazetat
H <sub>2</sub> O	Wasser

---

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HOCl	Hypochlorid
IFN- $\gamma$	Inferferon $\gamma$
IL-1/-6	Interleukin-1/-6
IMDM	Basal Iscoves Modified Dulbecco's Medium w/o L-Glutamin
KIP	Kinasen inhibierendes Protein (kinase-inhibitory protein)
LIF (ESGRO®)	Leukämie inhibierender Faktor (Leucemia inhibitory factor)
LSM	konfokales Laser-Raster-Mikroskop (laser scanning microscope)
M	Mitose
$\mu$ M	Mikromolar
MAPKinase	mitogen aktivierte Proteinkinase (mitogen-activated protein kinase)
MEF 2	myocyte enhancer factor 2
MEM	essentielle Aminosäurelösung (minimal essential aminoacids)
mg	Milligramm
$\alpha$ -MHC	$\alpha$ -Myosin schwere Kette ( $\alpha$ -myosin heavy chain)
$\beta$ -MHC	$\beta$ -Myosin schwere Kette ( $\beta$ -myosin heavy chain)
min	Minuten
ml	Milliliter
MLC	Myosin leichte Kette (myosin light chain)
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NADH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NEA	nicht essentielle Aminosäuren
NF- $\kappa$ B	nukleärer Faktor $\kappa$ B
Nkx 2.5	NK2 transcription factor related 5
nM	nanomolar
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit
O <sub>2</sub>	molekularer Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Superoxidradikal-Anion
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid-Anion
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singulett-Sauerstoff
OH <sup>•</sup>	Hydroxylradikal
PBS(T)	Phosphat gepufferte Salzlösung (mit Triton)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionenkonzentration
rpm	Umdrehungen pro Minute (round per minute)
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	reaktive Sauerstoffintermediate
ROS	reaktive Sauerstoffspezies

---

RT-PCR	Realttime oder quantitative Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
S	Synthese
s	Sekunden
TGF $\beta$	transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ (transforming growth factor $\beta$ )
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
Trolox	$\alpha$ -Tocopherol-Derivat
usw.	und so weiter
V	Volumen
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)
z.B.	zum Beispiel



# 1 Einleitung

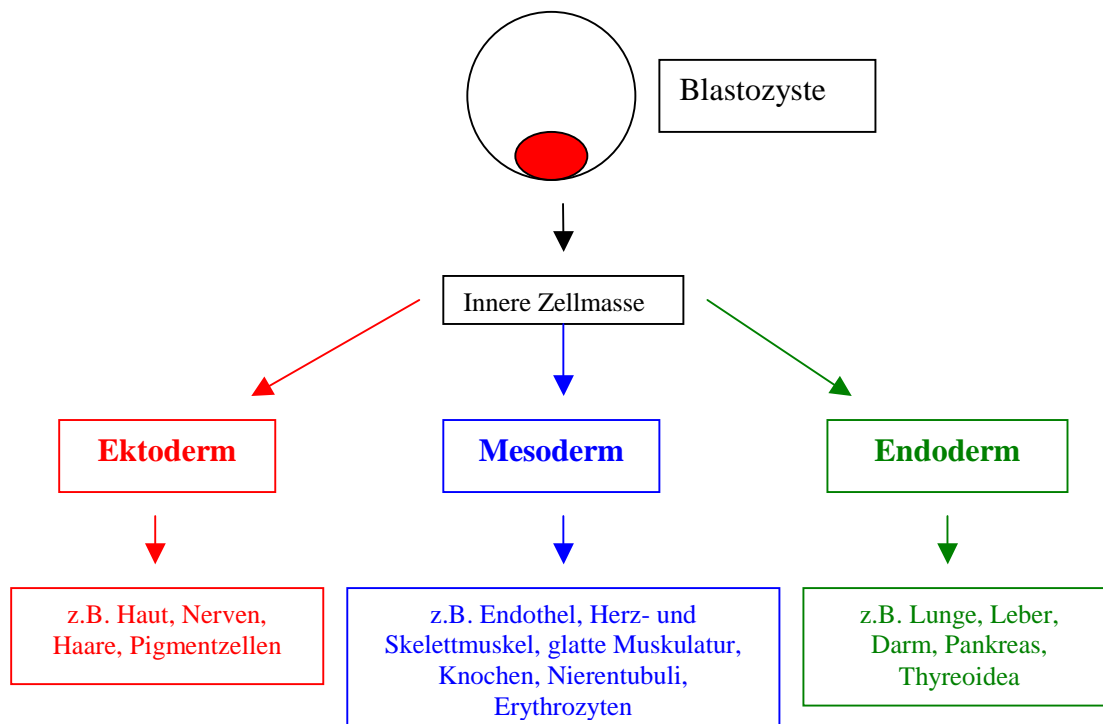
Die Proliferationsmechanismen in fetalen Kardiomyozyten sind kaum bekannt. Im frühen Embryo entwickelt sich das kardiovaskuläre System als erstes Organsystem, um die Bedürfnisse des Embryos nach Sauerstoff und Nährstoffen zu decken (Brand, 2003). Auch in embryonalen Stammzellen (ES Zellen) entstehen Kardiomyozyten (Herzmuskelzellen) und Gefäßzellen als einer der ersten Zelltypen (Hescheler et al., 1999). Aus bisher unbekanntem Gründen verlieren die Herzmuskelzellen im adulten Herz die Fähigkeit sich zu teilen (Ueno et al., 1988). Allerdings gibt es Diskussionen, ob adulte Kardiomyozyten sich nicht doch in geringem Maß teilen können (Beltrami et al., 2001; Ledda-Columbano et al., 2006; Pasumarthi et al., 2005). Diese Teilungsfähigkeit ist aber nicht ausreichend, um Schäden im Herzen zu reparieren. Es wurde festgestellt, dass bei adulten Kardiomyozyten die Akkumulation von Zyklin D1 im Kern gehemmt wird, was vermutlich ein wichtiger Grund dafür ist, dass die Kardiomyozyten im postmitotischen Stadium bleiben. Diese Akkumulation scheint charakteristisch für postmitotische Kardiomyozyten zu sein, was wiederum wichtig für das Umschalten von proliferierenden zu ausdifferenzierten Kardiomyozyten sein könnte, möglicherweise auch bei anderen ausdifferenzierten Zellen (Tamamori-Adachi et al., 2003). Aus diesem Grund ist es wichtig, die Kenntnisse über die Signalkaskaden, die für die Zellteilung der embryonalen Kardiomyozyten verantwortlich sind, zu erweitern. Im Fall einer Ischämie, die z.B. durch einen Herzinfarkt ausgelöst wurde, entstehen Sauerstoffradikale im betroffenen Gewebe (Berk, 1999; Hensley et al., 2000). Werden ES Zellen in den Körper injiziert, akkumulieren sie im geschädigten Gewebe und verteilen sich nicht im ganzen Körper (Hoehn et al., 2002). Möglicherweise werden die Kardiomyozyten durch Sauerstoffintermediate dazu angeregt, zu proliferieren.

## *1.1 Stammzellen*

Stammzellen besitzen im Vergleich zu anderen Zellen die einzigartige Fähigkeit, sich sowohl unendlich erneuern zu können als auch zu verschiedenen Zelltypen zu differenzieren. Sie bleiben so lange undifferenziert, bis sie ein Signal erhalten, sich in eine spezialisierte Zelle zu differenzieren. Diese Eigenschaft macht die Stammzellen für die Forschung interessant. Es

wird versucht, verschiedene Gewebe und Organe des Organismus durch pluripotente Stammzellen zu ersetzen und dadurch degenerative Erkrankungen wie z.B. Diabetes und chronische Herzerkrankungen zu behandeln (Blyszczuk and Wobus, 2006; Küstermann et al., 2005).

Stammzellen können aus noch nicht ausdifferenzierten Zellen von Embryos, Feten oder Adulten gewonnen werden. Sie entwickeln sich zu Zellen aus allen drei Keimblättern (Mesoderm, Endoderm und Ektoderm) und können sich unter bestimmten Bedingungen noch teilen und differenzieren. Im Gegensatz zu der so genannten „totipotenten“ befruchteten Eizelle (bis zu einigen Blastomeren im 16-Zellstadium), die sich noch zu einem vollständigen Organismus entwickeln kann, können aus den pluripotenten embryonalen Stammzellen die etwa 200 verschiedenen Zelltypen des Körpers entstehen.



**Abb. 1.1:** Differenzierung embryonaler Stammzellen

Man unterscheidet zwischen embryonalen und adulten Stammzellen. Adulte Stammzellen sind undifferenzierte, multipotente Zellen, die nur in eine bestimmte Anzahl von Zelltypen differenzieren können. Sie sind schwierig zu identifizieren, zu isolieren und zu kultivieren. Die wichtigsten Informationen über adulte Stammzellen stammen aus Forschungsergebnissen mit hämatopoetischen adulten Stammzellen aus dem Knochenmark und Blut, sie sind aber auch in Leber, Gehirn, Skelettmuskel, Herzmuskel, Zahnpulpa, Kornea und Retina zu finden

(Passier and Mummery, 2003; Winslow, 2001). Ein Vorteil von adulten Stammzellen liegt darin, dass sie Patienten im Rahmen einer Therapie problemlos entnommen und nach einer Ausdifferenzierung ohne Abstoßungsreaktion implantiert werden können.

Die pluripotenten Stammzellen aus Säugetierembryonen werden nochmals in drei Arten unterteilt: embryonale Karzinomzellen (ECC, embryonic carcinoma cells), ES Zellen und Zellen in frühen Keimanlagen der Embryonen (EGC, embryonic germ cells).

- Embryonale Karzinomzellen werden aus Teratokarzinomen, einem Tumor, der gelegentlich in den Gonaden eines Embryos entsteht, gewonnen. Sie weisen allerdings verschiedene Nachteile, wie z.B. einen instabilen Karyotyp, auf.
- Zellen aus den frühen Keimanlagen werden von den Vorläufern der Geschlechtszellen, den primordialen Keimzellen im 5 - 10 Wochen alten Fetus, abgeleitet. Sie verhalten sich ähnlich wie ES Zellen, können beim Menschen jedoch keine Kardiomyozyten bilden (Boheler et al., 2002).
- ES Zellen werden aus Blastozysten am 5. bis 6. Tag nach der Befruchtung aus einem Aggregat von etwa 100 Zellen gewonnen. Die Blastozyste (Keimblase) besteht aus dem flüssigkeitsgefüllten Blastocoel im Inneren der epithelartigen Zellschicht des Trophoblasten und den Zellen des Embryoblasten, auch als Embryonalknoten oder innere Zellmasse bezeichnet, die als Zellhaufen an einer Stelle an der Innenseite der Hohlkugel liegen und später den Embryo bilden. Die ES Zellen sind im Embryonalknoten enthalten.

Stammzellen besitzen die Fähigkeit, sich selbst in einem undifferenzierten Stadium zu halten. Sie behalten einen normalen und stabilen Karyotyp und die Fähigkeit zu unbegrenzter Selbsterneuerung. Das undifferenzierte Stadium von ES Zellen wird durch ein Gleichgewicht verschiedener zellspezifischer Marker charakterisiert. Es gibt einerseits bestimmte Signaltransduktionswege, wie den LIF-abhängigen JAK/STAT3 Signalweg und den TGF  $\beta$  Weg. Andererseits gibt es bestimmte Transkriptionsfaktoren wie Oct-4, die *in vitro* in ES Zellen und *in vivo* in der inneren Zellmasse der Embryonen gebildet werden und die Zellen in einem pluripotenten, undifferenzierten Stadium halten (Pesce et al., 1998). Wird dieses Gleichgewicht verschoben, beginnen die ES Zellen zu differenzieren (Smith, 2005).

ES Zelllinien der Maus werden schon seit vielen Jahren verwendet. Die Zellen werden auf inaktivierten embryonalen Fibroblasten der Maus oder auf gelatinisierten Zellkulturschalen kultiviert. Die Differenzierung der Zellen wird durch das Zytokin LIF (Leucemia Inhibitory Factor), das von den embryonalen Fibroblasten in das Nährmedium abgegeben wird, verhindert (Burdon et al., 1999; Evans and Kaufmann, 1981; Martin, 1981). Werden die



Fibroblasten oder die Differenzierungsinhibitoren entzogen, differenzieren die pluripotenten Zellen spontan zu den verschiedenen Zelltypen, unter anderem auch zu Kardiomyozyten.

Bei der Kultivierung in Spinnerflaschen oder in so genannten „Hängenden Tropfen“ bilden die Zellen dreidimensionale Zellaggregate, die „embryoid bodies“ (EBs). Durch die Aggregation zu EBs werden *in vitro* Zell-Zellverbindungen ermöglicht, die auch *in vivo* während der normalen Embryogenese auftreten. Die *in vitro* Differenzierung der embryonalen Stammzellen ermöglicht sowohl detaillierte Untersuchungen zur Aufklärung von Entwicklungsmechanismen als auch zur Erzeugung spezifischer Zelltypen für die Bildung von Gewebe. Die Differenzierungsfähigkeit der Zellen zu Kardiomyozyten wird dabei stark durch verschiedene Faktoren beeinflusst, unter anderem durch die Ausgangszahl der Zellen in den EBs, die ES Zelllinien, die Zusammensetzung des Mediums, die Qualität des fetalen Kälberserums, der Wachstumsfaktoren und der sonstigen Zusätze sowie das Alter der Ausplattierung der EBs (Wobus et al., 2002).

## ***1.2 Kardiomyozyten***

Wie beim Skelettmuskel ist ein Sarkomer in Herzmuskelzellen aus parallel angeordneten dicken und dünnen Filamenten aufgebaut. Das häufigste Protein in den dicken Filamenten ist Myosin, das häufigste der dünnen Filamente ist Aktin. Nach der Gleitfilamenttheorie von Huxley findet die Kontraktion in Form einer gleitenden Parallelbewegung von Aktin und Myosin statt.

Aktin ist für eine normale Struktur und Funktion der Kardiomyozyten essentiell. Während der Entwicklung werden 5 der 6 Aktin-Isoformen, die durch verschiedene Gene kodiert werden, in Myozyten exprimiert. In adulten Kardiomyozyten wird nur kardiales und skelettales Aktin exprimiert, wobei kardiales Aktin überwiegt (80%).

Die Bildung der Vorhöfe und Kammern ist ein wichtiger Schritt während der normalen Herzentwicklung. Verschiedene Gene werden in der für sie spezifischen Region erst relativ spät während der Herzentwicklung exprimiert, normalerweise erst nach der Bildung der Septen, teilweise in der neonatalen Phase. Das Atriale Natriuretische Peptid (ANP) beispielsweise wird während der Entwicklung sowohl in den Vorhöfen als auch in den Kammern exprimiert und ist erst nach der Geburt spezifisch für die Vorhöfe (Zeller et al., 1987). Die Isoform der Myosin Leichte-Kette-2 (MLC 2v) dagegen spezifiziert sich schon

relativ früh während der Kardiogenese im Ventrikel (Kubalak et al., 1994). Das MLC 2v wird sowohl in Herzmuskelzellen als auch in langsamen Skelettmuskeln der Maus exprimiert. Studien an ES Zellen zeigen, dass die Expression des MLC 2v Genes unabhängig von der Entwicklung eines intakten Herzschlauches erfolgen kann (Miller-Hance et al., 1993). Im Vorhof wird eine andere Isoform des MLC 2 exprimiert, das atriale MLC 2 (MLC 2a) (Hailstones et al., 1992).

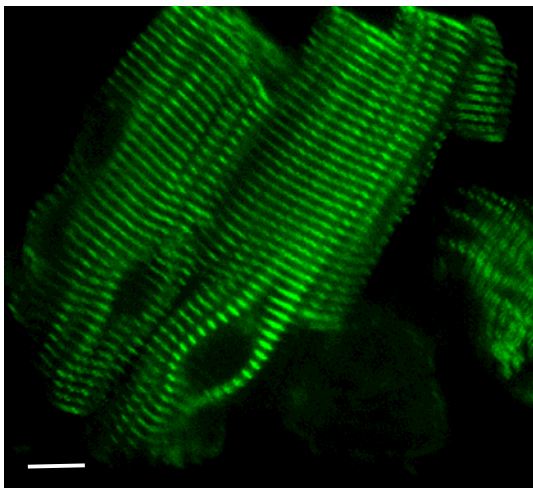
Kardiomyozyten sind im frühen Stadium der Differenzierung klein und rund, später nehmen sie an Länge, nicht an Breite, zu. Anfangs sind die Myofibrillen unregelmäßig oder fehlen, andere haben parallele Bündel von Myofibrillen mit A- und I-Banden. Später entwickeln sich langgezogene Kardiomyozyten mit gut organisierten Myofibrillen mit deutlichen A- und I-Banden, Z-Streifen und Glanzstreifen und Sarkomeren und einem meist zentralen Kern (Snir et al., 2003; Kehat et al., 2002).

Bei differenzierten Stammzellen sind Kardiomyozyten leicht zu identifizieren, da sie innerhalb von 1 - 4 Tagen nach dem Ausplattieren spontan kontrahieren (Kehat et al., 2002). Schon bei 6 Tage alten EBs werden Kardiomyozyten gefunden. Dementsprechend kann bei Embryonen an Tag 7,5 - 9,5 das erste Schlagen festgestellt werden (Hescheler et al., 1999). Mit weitergehender Differenzierung erhöht sich die Anzahl der schlagenden Areale, bis alle EBs kontrahierende Zellen besitzen können. Da die EBs noch zu anderen Zellen, z.B. Endothelzellen, differenzieren, kontrahiert sich nicht der gesamte EB, sondern nur ein bestimmter Bereich, der normalerweise am Rand des EBs mit einem Durchmesser von 0,2 - 2 mm erscheint. Die Frequenz der schlagenden Areale erhöht sich mit weitergehender Differenzierung (Hescheler et al., 1977). Die Schlagfrequenz der Kardiomyozyten *in vitro* liegt sowohl bei den Stammzellen als auch bei den isolierten neonatalen Herzmuskelzellen bei 60 - 100 Schlägen pro Minute und stimmt damit nicht mit der Kontraktionsfrequenz des Herzens der Maus *in vivo* (450 - 650 Schläge pro Minute) überein.

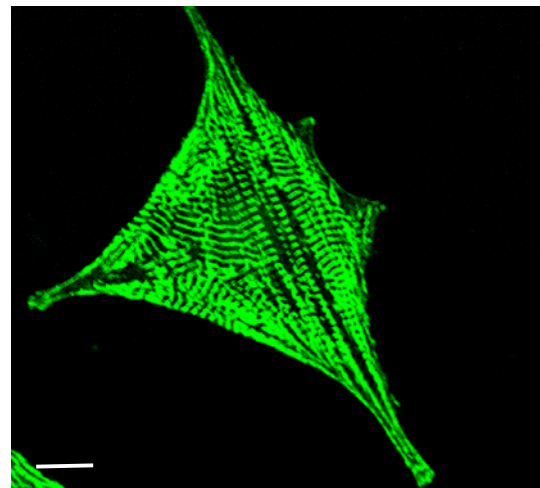
Kurz nach der Geburt wird die Zellteilung der Kardiomyozyten *in vivo* stark reduziert. Die hyperplastische Phase dauert bis etwa 4 Tage nach der Geburt an; in dieser Zeit bleibt das Volumen relativ konstant, obwohl das Herzgewicht durch Zellteilung zunimmt. Zwischen Tag 5 und Tag 15 post natum erhöht sich das Volumen stark. Ab 15 Tage nach der Geburt erfolgt eine rein hypertrophe Phase, in der das Wachstum durch Zunahme der Myofibrillen und Sarkomeren erfolgt (Clubb and Bishop, 1984). Diese Zunahme kann auch zu stark sein, so dass es zu einer pathologischen Hypertrophie führt, aus der eine Herzinsuffizienz entsteht.

Die Kardiomyozyten erreichen ihr Endgewicht in einem Alter von etwa 3 Monaten (Leu, Ehler and Perriard, 2001).

Immunhistochemisch können Kardiomyozyten durch eine Antikörperfärbung auf  $\alpha$ -Aktinin identifiziert werden. Das  $\alpha$ -Aktinin ist ein Aktin-Bindungsprotein, das sowohl in Muskelzellen als auch in anderen Zellen exprimiert wird. In normalen Muskelzellen ist  $\alpha$ -Aktinin mit den Z-Scheiben verbunden, in glatter Muskulatur befindet es sich vor allem in Dense-Körperchen und Plaques, die für dieses Gewebe charakteristisch sind. Das monoklonale Anti- $\alpha$ -Aktinin bindet spezifisch an das  $\alpha$ -Aktinin der Skelett- und Herzmuskeln. Es färbt die Z-Scheibe und Punkte in Stressfasern von Myotubuli, allerdings nicht die nicht-sarkomerischen Muskelemente (Bindegewebe, Epithel, Nerven, glatte Muskulatur). Dadurch lässt sich in den Kardiomyozyten die typische Querstreifung nachweisen.



**Abb. 1.2.1:** Kardiomyozyten einer adulten Maus, Färbung mit  $\alpha$ -Aktinin; der Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$



**Abb. 1.2.2:** Kardiomyozyten aus Stammzellen, Färbung mit  $\alpha$ -Aktinin; der Balken entspricht 15  $\mu\text{m}$

### 1.3 Zellzyklus

Die Proliferation von Säugetierzellen muss einer genauen Kontrolle unterliegen, um die Häufung von genetischen Schäden zu vermeiden. Dieser Prozess wird durch molekulare Kreisläufe, sogenannte Kontrollpunkte (checkpoints), kontrolliert, die es in allen eukaryontischen Zellen gibt (Nurse, 1997). Es handelt sich um ein komplexes Netzwerk aus Proteininteraktionen, welche die Aktivität der Zyklin-abhängigen Kinasen überwachen.

Entweder folgt auf die Phasen des Zellzyklus (G1, S = Synthesephase und G2) eine Mitose (M), Quieszenz (Ruhephase; G0) oder Zelltod. Die Quieszenz ist im Gegensatz zur Seneszenz und terminalen Differenzierung eine reversible Form des Zellzyklusarrest und erlaubt unter bestimmten Stimulationsbedingungen ein Wiedereintreten in den Zellzyklus. Es gibt 3 wichtige Kontrollpunkte des Zellzyklus: G1/S, G2/M und M. Der G1/S-Kontrollpunkt überwacht beim Eintritt in die S-Phase, ob die Zellen groß genug sind, um eine neue DNA-Synthese zu ermöglichen, Schäden an der DNA repariert wurden und die äußeren Bedingungen für eine mitotische Zellteilung günstig sind. Durch den G2/M-Kontrollpunkt wird beim Eintritt in die Mitose-Phase überprüft, ob die DNA vollständig repliziert wurde, neue Schäden an der DNA repariert wurden und die Zellen groß genug für eine Teilung sind (Tyson, Csikasz-Nagy and Novak, 2002).

Die wichtigsten Enzyme des Zellzyklus sind die Zyklin-abhängigen Kinasen (CDKs). Wie der Name schon sagt, benötigen sie Zykline, um aktiv zu sein. Sind die CDKs an die entsprechenden Zykline gebunden, leiten sie wichtige Ereignisse des Chromosomenzyklus durch Phosphorylierung bestimmter Zielproteine ein. Für die Kontrolle des Zellzyklus gibt es neben diesen positiven Signalen auch negative Signale (z.B. p21<sup>CIP1</sup>, p27<sup>KIP1</sup> und die Tumorsuppressorgene Retinoblastom (Rb) und p53); diese beeinflussen sich gegenseitig.

Die Zykline A-H binden an Zyklin-abhängige Kinasen, bilden Zyklin/CDK-Komplexe und kontrollieren dadurch die Phosphorylierung.

Säugerzellen benötigen in der Zellkultur mitogene Stimuli, um die G0-Phase zu verlassen und wieder zu proliferieren. Erst dann können sie in die S-Phase übergehen und einen weiteren Zellzyklus durchführen, auch in Abwesenheit von Mitogenen. Die mitogenen Signale sind in den Ras-Signalweg eingebunden, der die Konzentrationen von Zyklin D1 und Zyklin E erhöht. Diese stimulieren jeweils CDK 4/6 und CDK 2, welche wiederum die Phosphorylierung des Rb bewirken (Costa et al., 1998; Woo and Poon, 2003). Dieses ist wichtig für den Übergang von der G1- zur S-Phase. Rb besitzt drei funktionell wichtige

Bindungsdomänen und interagiert mit kritischen Regulatorproteinen, z.B. die E2F-Familie der Transkriptionsfaktoren und c-Abl Tyrosinkinase (Nevins, 1992).

In der frühen und mittleren G1-Phase bindet Rb an den Transkriptionsfaktor E2F und unterdrückt ihn dadurch (Dyson, 1998). Die Zyklin D/CDK 4/6-Komplexe phosphorylieren das Rb-Protein und bewirken dadurch, dass es sich von den E2F-Transkriptionsfaktoren trennt, was zur Aktivierung der E2F-Transkriptionsfaktoren, die den Übergang von G1 zu S bewirken, führt. E2F 1 - 6 binden an DP-Proteine und bilden dadurch aktive Transkriptionsfaktoren.

Um abnormale Zellproliferation zu vermeiden, werden die Zyklin/CDK-Komplexe durch zwei Familien von Zellzyklus-Inhibitoren, welche die katalytische Aktivität blocken, reguliert. Die erste Gruppe der Inhibitoren beinhaltet die INK 4a Proteine (z.B. p18<sup>INK4C</sup>), die nur an CDK 4- und 6-Kinasen binden und nicht an Zykline. Daher sind sie spezifisch für die frühe G1-Phase. Die zweite Gruppe der Inhibitoren setzt sich aus CIP- und KIP-Proteinen (KIP = kinase inhibitory protein) zusammen, die nach ihrem Molekulargewicht und dem Kodierungsgen benannt sind, wie p21<sup>CIP1</sup>, p27<sup>KIP1</sup> und p57<sup>KIP2</sup>. Sie hemmen alle Zyklin/CDK-Komplexe und sind daher für keine bestimmte Phase spezifisch (Sherr and Roberts, 1999). Da p21<sup>CIP1</sup> und p27<sup>KIP1</sup> eine sehr ähnliche Primärstruktur besitzen wird vermutet, dass sie durch ähnliche Mechanismen wirken (Russo et al., 1996).

Ki-67 ist ein im Kern exprimierter Marker für Zellzyklusaktivität und Zellteilung. Es wird in allen proliferierenden Zellen sowohl in der späten G1, S und G2 als auch in den Mitose-Phasen gebildet. In ruhenden Zellen (G0) ist Ki-67 nicht nachweisbar. In der Interphase wird das Antigen ausschließlich innerhalb des Kerns gefunden, wohingegen es sich während der Mitose auf der Oberfläche der Chromosomen befindet. Durch die ausschließliche Ausbildung in aktiven Zellen eignet es sich sehr gut als Marker für sich teilende Zellen. Ein weiterer Vorteil dieses Markers besteht darin, dass es nicht in die Reparatur von DNA involviert ist (MacCallum and Hall, 2000) und dadurch nicht bei Reparaturprozessen gebildet wird.

## ***1.4 kardiale Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktoren***

Ausführliche Studien der herzspezifischen Genregulierung zeigen, dass die Proteine GATA, Nkx 2.5 und MEF 2C die hauptsächlichen Transkriptionsregulatoren der kardiomyozytären Zelldifferenzierung sind (Brand, 2003). Die Transkriptionsfaktoren GATA 4 und Nkx 2.5 verstärken sich wechselseitig in den frühen Phasen der Herzentwicklung; später wirken GATA 4 ebenso wie Nkx 2.5 und TBX 5 kooperativ in der Transkription nachgeordneter kardialer Gene und werden auch im adulten Herzen exprimiert (Garg et al., 2003).

GATA 4 ist ein wichtiger Regulator der gewebespezifischen Genexpression in vielen mesodermalen und endodermalen Geweben. In Kardiomyozyten reguliert es die Expression verschiedener Gene, z.B.  $\alpha$ - $\beta$ -MHC, kardiales Troponin C und I, ANP und brain natriuretic peptide (BNP).

Nkx 2.5 ist essentiell für die Morphogenese, Maturation, Spezifikation und Erhaltung des Atrioventrikular-Knotens, der verschiedenen myozytären Zelllinien des Ventrikelmyokards und für die physiologische Entwicklung des Ventrikelseptums. Während der Kardiogenese lässt sich Nkx 2.5 im Hiss'schen Bündel, jedoch nicht in den peripheren Purkinje-Fasern, nachweisen (Harris et al., 2005).

MEF 2C ist für eine korrekte Herzentwicklung nötig. Durch zielgerichtete Mutation der MEF 2C-Gene wurde nachgewiesen, dass bestimmte Faktoren, darunter MLC 2v, kardiales Troponin T, kardiales Troponin I,  $\alpha$ -MHC, ANP,  $\alpha$ -kardiales Aktin ( $\alpha$ -CA) und Desmin MEF 2C für eine optimale Transkription benötigen (Di Lisi et al., 1998; Morin et al., 2000).

DTEF-1, ein weiterer Transkriptionsfaktor, wird als Vermittler der Effekte einer  $\alpha$ -adrenergen Stimulation mit der Genexpression der Muskeln benötigt. Allerdings hat es keinen Einfluss auf die Aktivität des MLC 2v Promoters und führt nur zu einer geringen Aktivierung des  $\beta$ -MHC Promoters (Azakie et al., 2005). Eine Entfernung der DTEF-1 Expression führt bei der Maus zu anormaler Herzentwicklung bis hin zu embryonalem Tod (Maeda et al., 2002).

Im Gegensatz zu den anderen Wachstumsfaktoren ist die Expression von BMP-10 auf das sich entwickelnde und postnatale Herz beschränkt (Neuhaus et al., 1999). Während der Embryonalentwicklung der Maus wird das Zytokin BMP-10 ganz spezifisch nur im trabekulierten Teil der Ventrikelwand und im Atrium exprimiert. Es wird außerdem für die normale Expression verschiedener kardiogener Schlüsselfaktoren, z.B. Nkx 2.5 und MEF 2C, im sich entwickelnden Myokard benötigt (Chen et al., 2004).

## 1.5 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Da der molekulare Mechanismus und die vollständige Signaltransduktion der kardialen Entwicklung noch nicht vollständig bekannt sind, ist es bisher nicht möglich, eine herzspezifische Entwicklung der ES Zellen zu induzieren. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass die Kardiomyogenese embryonaler Stammzellen der Maus und damit die Bildung der an der Kardiomyogenese beteiligten Transkriptionsfaktoren und der kardialen Marker sowohl durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species) als auch durch Stickstoffmonoxid (NO) stimuliert werden kann (Sauer and Wartenberg, 2005).

Freie Radikale und andere ROS entstehen als Nebenprodukte in den Zellen eines oxidativen Metabolismus. Radikale sind koordinativ ungesättigte Atome und Moleküle, auf deren äußerer Elektronenhülle sich ein unpaariges Elektron befindet. Dazu gehören Moleküle wie das Superoxid-Anion ( $O_2^{\bullet-}$ ), das Hydroxylradikal ( $OH^{\bullet}$ ), Stickstoffmonoxid ( $NO^{\bullet}$ ) und Lipid-Radikale. Andere ROS wie  $H_2O_2$ , Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) und hypochlorische Säure (HOCl) sind selbst keine freien Radikale, haben aber oxidierende Effekte, die zum oxidativen Stress beitragen. Die zelluläre Produktion eines Typs von ROS kann durch verschiedene Radikal-Kettenreaktionen zur Produktion anderer ROS führen (Cai and Harrison, 2000).

Diese Radikale mit ungepaarten Elektronen entreißen anderen Molekülen oder Atomen Elektronen und führen dadurch zu einer Zell- und Gewebeschädigung. Sie können DNA-Strangbrüche induzieren, Onkogene aktivieren oder Tumorsuppressorgene inhibieren, Enzyme und Proteine inaktivieren oder zur Lipidperoxidation führen. Da sie eine hohe Reaktivität besitzen, können sie mit fast allen molekularen Strukturen der Zelle reagieren, was je nach Lebensdauer, Bildungsort und Reaktionspartner des Radikals zu strukturellen und funktionellen Störungen bis hin zum Zelltod führen kann.

Inzwischen ist bekannt, dass ROS in aeroben Zellen auch physiologische Funktionen in Signaltransduktionswegen und bei der Immunabwehr durch Phagozyten haben (Babior, 2000; Chandel and Schumacker, 2000). So konnte gezeigt werden, dass ROS das Wachstum von Zellen stimulieren oder hemmen und den Zelltod im Sinne einer Nekrose oder einer Apoptose auslösen können. Das Superoxid-Anion  $O_2^{\bullet-}$  aktiviert verschiedene sekundäre Botenstoffe (*second messenger*), die typisch für Mitogene sind (Berk, 1999). Dabei können ROS an sich als sekundäre Botenstoffe fungieren: ihre Synthese erfolgt in einer schnellen und einfachen Reaktion, sie sind gut löslich, werden schnell wieder abgebaut und sind ubiquitär in allen

Zellen präsent (Gabbita et al., 2000). Bestimmte Zellen, wie z.B. Neutrophile und Phagozyten, nutzen  $H_2O_2$  und  $\cdot NO$  als chemische Verteidigung gegen Bakterien („oxidative burst“) (Babior, 2000). Während diese Oxidantien für den Schutz vor Infektionen lebensnotwendig sind, können sie bei chronischen Entzündungen oxidative Schäden auslösen.

ROS werden in vielen verschiedenen Zelltypen gebildet. Die Stimulation erfolgt u.a. durch Hypoxie (Chandel et al., 2000; Kulisz et al., 2002, Sauer et al., 2004), Zytokine wie den Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Interleukin-1 und 6 (IL-1, IL-6) und Angiotensin II (Ang II) (Lassegue et al., 2001; Thannickal and Fanburg, 1995), Wachstumsfaktoren (Chandel et al., 2001; Krieger-Brauer and Kather, 1995) und andere Agonisten, die durch die Tyrosin-Kinase und andere G-Protein-gebundene Rezeptoren wirken (Krieger-Brauer and Kather, 1995).

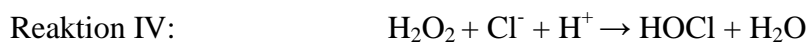
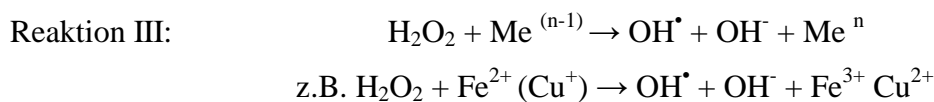
ROS werden bei verschiedenen Stoffwechselfvorgängen in den unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle freigesetzt, vor allem in den Mitochondrien, die etwa 2% des angefallenen Sauerstoffs bei der mitochondrialen Atmung umwandeln. Bei der oxidativen Phosphorylierung werden Elektronenpaare der energiereichen Moleküle NADH und  $FADH_2$ , welche bei der Glykolyse, der Fettsäureoxidation und dem Zitratzyklus entstehen, auf molekularen Sauerstoff übertragen. Die dabei freiwerdende Energie wird zur ATP-Erzeugung verwendet. Während der Elektronenübertragung kann es durch unvollständige Reduktion von Sauerstoff zur Entstehung von ROS kommen (Thannickal et al., 2000). Die dabei gebildeten ROS sind  $H_2O_2$  und  $O_2^{\cdot -}$  (Chance et al., 1979). Bedingungen, welche die Bildung von Superoxid in der Atmungskette begünstigen, sind ein hohes Membranpotential (geringe ATP-Synthase-Aktivität) und/oder die Hemmung des Elektronentransports durch Inhibitoren oder Mutationen.

Weitere Quellen der ROS sind die NADPH-Oxidasen (reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat), Xanthinoxidase, Cyclooxygenase und Lipoxygenase (Bachschmid, Schildknecht und Ullrich, 2005).

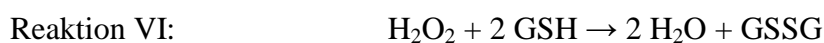
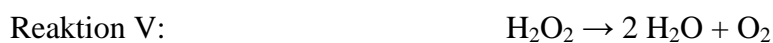
Nach der Übertragung eines Elektrons auf das Superoxid-Anion wird durch die NADPH-Oxidase und die Superoxiddismutase (SOD) das stabilere und membranpermeable Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) gebildet (Reaktion I - II). Dieses wird dann im nächsten Reduktionsschritt unter Anwesenheit von Übergangsmetallionen (Me) oder Semichinonen in das reaktionsfreudige Hydroxylradikal ( $OH^{\cdot}$ ), einen extrem kurzlebigen Metaboliten,



überführt (Haber-Weiss- oder Fenton-Reaktion, Reaktion III). Sowohl die Ferrylkomplexe als auch die Hydroxylradikale sind extrem potente Einelektronenakzeptoren und damit Initiatoren der Radikalketten mit hoher Zelltoxizität.  $\text{H}_2\text{O}_2$  kann auch durch Myeloperoxidase oder Chlorperoxidase zu hypochlorischer Säure metabolisiert werden, das als gutes Bakterizid bekannt ist (Reaktion IV).



Wasserstoffperoxid ist ein Produkt der Reduktion des molekularen Sauerstoffs, das direkt aus Superoxid durch Dismutation entsteht (Reaktion II). Es wird durch Katalase zu Wasser und Sauerstoff abgebaut (Reaktion V) oder durch Glutathionperoxidase zu Wasser und oxidiertem Glutathion (Reaktion VI).



Wasserstoffperoxid aus der Gruppe der nicht-radikalischen ROS entsteht unter physiologischen Bedingungen bei verschiedenen Enzymreaktionen als Endprodukt vieler Oxidationsreaktionen vor allem in den Peroxisomen, wo es beim Fettsäureabbau hilft. Es wird ebenfalls bei Entgiftungsreaktionen in der Leber (Cytochrom P450) benötigt. Es ist gut wasserlöslich und membranpermeabel (Dreher and Junod, 1995) und kann sowohl Oxidations- als auch Reduktionsmittel sein. Die biologische Halbwertszeit ist abhängig von der Anzahl der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -abbauenden Enzyme wie Katalase und Glutathionperoxidase, welche für ein Gleichgewicht zwischen Entstehung und Abbau verantwortlich sind.

Eine exogene Applikation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  induziert bei Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, z.B. dem EGF-Rezeptor, eine Autophosphorylierung und dadurch eine Aktivierung (Goldkorn et al., 1998; Peus et al., 2000).

Stickstoffoxide ( $\cdot\text{NO}$ ) entstehen durch 3 Isoformen einer NO-Synthase (NOS): die endotheliale Form (eNOS) im Endothel der Gefäße, die induzierbare (iNOS) z.B. in Makrophagen und anderen Zellen bei der Immunabwehr und die neuronale Form (nNOS) im Nervensystem. Diese Enzyme produzieren aus L-Arginin und Sauerstoff  $\cdot\text{NO}$  und L-Citrullin. Eine andere Synthesemöglichkeit des  $\cdot\text{NO}$  ist der Umbau von Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) zu  $\cdot\text{NO}$  unter sauren Bedingungen, ein Prozess, der in Anwesenheit von Deoxyhämoglobin beschleunigt wird (Kanno et al., 2004).

$\cdot\text{NO}$  kann aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften ungehindert Membranen überwinden und direkt ins Gewebe diffundieren. Es führt zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und wirkt dadurch über eine Aktivierung der Guanylatzyklase vasorelaxierend und Blutdruck senkend (Daiber und Ullrich, 2002).

$\cdot\text{NO}$  reagiert mit Sauerstoff in wässriger Lösung zu Stickstoffdioxid (Reaktion VII).



Reagieren die freien Radikale mit anderen Molekülen, entstehen wieder neue freie Radikale. Diese Kettenreaktion kann nur durch so genannte Radikalfänger (free radical scavenger) unterbrochen werden, die die Akkumulation der freien Radikale durch enzymatischen Abbau (Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Katalase) und/oder durch nicht-enzymatische Antioxidantien (Glutathion und Vitamine C und E) verhindert. Die Superoxiddismutase wandelt Superoxidradikale in Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) um, Katalase und Glutathionperoxidase bauen das  $\text{H}_2\text{O}_2$  weiter zu  $\text{H}_2\text{O}$  ab. Die niedermolekularen Antioxidantien können direkt mit den freien Radikalen interagieren und sie durch Bildung von Komplexen unschädlich machen. Vitamin E verhindert die Lipidperoxidationen und reduziert Lipidradikale unter der Bildung wenig reaktiver Vitamin E-Radikale. Dadurch schützt es vor allem die Zellmembran (Takenaka et al., 1991). Vitamin C überführt die dabei entstandenen Vitamin E-Radikale unter Bildung von Semihydroascorbaten wieder zu Vitamin E. Da Vitamin C stark autooxidativ ist, kann es ebenso mit Superoxid-Anionen und Hydroxylradikalen reagieren. Glutathion (GSH) stellt das Hauptreduktionsmittel aller eukaryontischen Zellen dar und dient als Substrat für die Glutathionperoxidase.

ROS besitzen auch Aufgaben in der Signaltransduktion, z.B. bei der Aktivierung und Regulation von Transkriptionsfaktoren, z.B. des nukleären Faktors  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) und des

Aktivator-Proteins 1 (AP-1). Andere Beispiele für Aufgaben der ROS sind Aktivierung/Inaktivierung der Rezeptor-Kinasen und -Phosphatasen. Auch Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskaden (MAPKinase) können durch ROS modifiziert werden. Die genauen Mechanismen der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren durch ROS sind jedoch nicht bekannt.

Da alle ROS unter zellulären Bedingungen reduziert werden, verschieben sich die Redoxsysteme der Zelle wie Glutathion, Ascorbinsäure, Tocopherole, Liponsäure oder Bilirubin und Harnsäure zu ihren oxidierten Formen. Für diese Situation wurde der Begriff oxidativer Stress geprägt (Daiber und Ullrich, 2002). Oxidativer Stress scheint ganz spezifisch solche Enzyme zu stimulieren, die Oxidantien abbauen oder Zellstrukturen reparieren. Oxidativer Stress wird durch vermehrte Bildung von Stickstoff- und Sauerstoffspezies, verminderten Schutz durch Antioxidantien oder das Ausbleiben der Beseitigung von oxidativen Schäden ausgelöst. Auch überschießende Entzündungsreaktionen führen zu einer überhöhten ROS-Produktion, Zerstörung von gesundem Körpergewebe und der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen.

### 1.5.1 NADPH-Oxidase

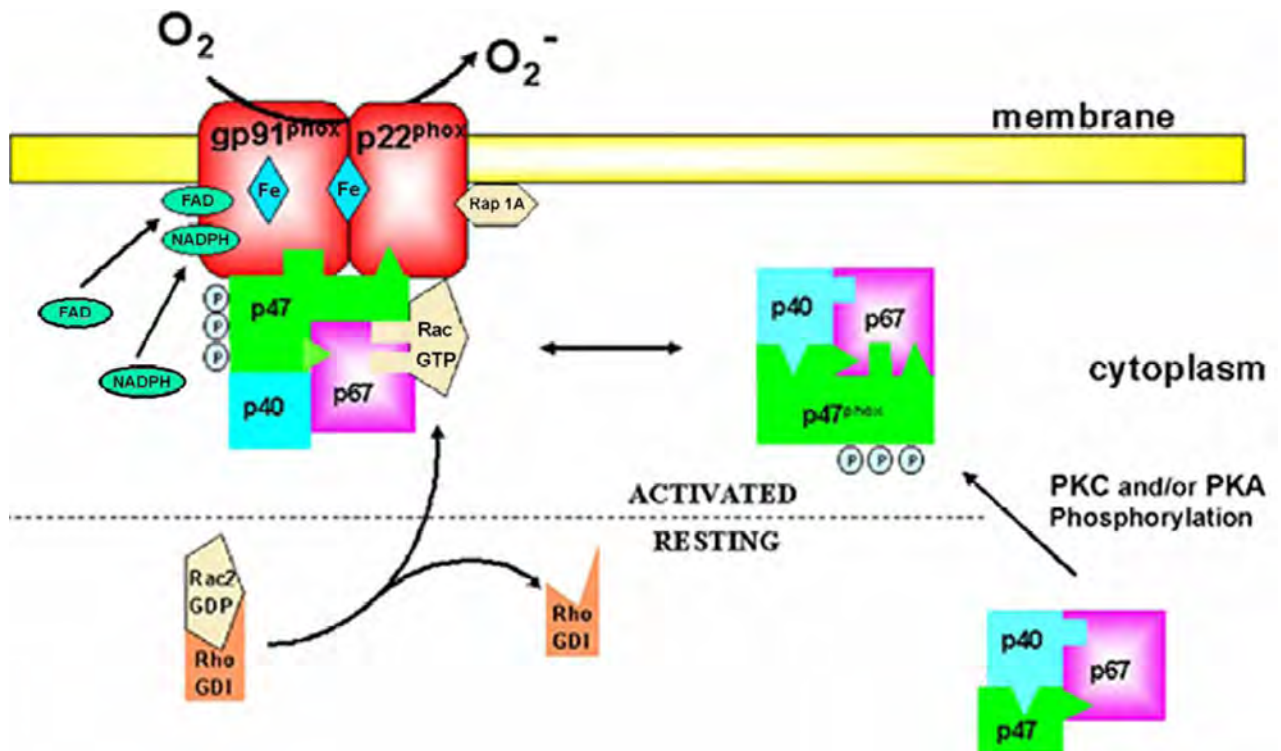
Neben ihrer Funktion bei der Abwehr von Mikroorganismen, bei der die NADPH-Oxidase ROS an der Plasmamembran der Lymphozyten bildet (respiratory burst), scheinen ROS auch in nicht-phagozytierenden Zellen, z.B. in Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Chondrozyten und Fibroblasten (Bayraktutan et al., 1998) als Signalmoleküle bei der Regulation physiologischer Prozesse der Zelle zu dienen.

Die NADPH-Oxidase ist ein multimerer Komplex, der aus mehreren Untereinheiten besteht, und zwar zwei membranständigen Proteinen, gp91*phox* und p22*phox* (*phox* = 'phagocyte oxidase'), die auch als Cytochrom b<sub>558</sub> bezeichnet werden und den zytosolischen Bausteinen p47*phox*, p67*phox*, p40*phox* und Rac2. Im inaktiven Zustand liegt der zytosolische Komplex des Enzyms getrennt vom membranständigen vor. Im Zytosol binden p47*phox* und p67*phox* an p40*phox* (Quinn et al., 1992).

Erst nach Aktivierung durch physiologische Stimuli, beispielsweise Phagozytose von Fremdkörpern, chemotaktisch wirkende Substanzen (Leukotrien B<sub>4</sub>, Komplementfaktor C5a, und Interleukin 8) oder durch Stimulation *in vitro* werden die einzelnen Komponenten in die aktive Form der NADPH-Oxidase überführt. Dabei kommt es zunächst zu einer Phosphorylierung der zytosolischen Einheit p47*phox*, die daraufhin zur membranständigen Einheit transloziert und sich dort an die membranständigen Komponenten bindet (Park et al., 1994). Die Aktivierung des Enzyms erfolgt meist über Phosphorylierung an verschiedenen Stellen des zytosolischen Komplexes. Dieser geht eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) voraus, die zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphaten (PIP<sub>2</sub>) führt und die sekundären Botenstoffe Inositol-1,2,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) und 1,2-diacylglycerol (DAG) aktiviert. IP<sub>3</sub> löst die Freisetzung von intrazellulär gespeichertem Kalzium aus, welches zusammen mit dem gebildeten DAG die Proteinkinase C aktiviert. Weitere Enzyme, die wahrscheinlich ebenfalls an der Aktivierung der NADPH Oxidase auf anderen Wegen beteiligt sind, sind die Phospholipase D (PLD), Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI 3-K) und Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) (Condliffe et al., 1998).

Des Weiteren gibt es Hinweise auf eine Bedeutung der GTP-bindenden Proteine Rap 1A und Rac für die Funktionalität der NADPH-Oxidase. Rac, ein GTP-bindendes Protein, ist unabdingbar für die optimale Bildung von O<sub>2</sub><sup>•-</sup> in neutrophilen Granulozyten. Rac scheint nicht die Vereinigung der Untereinheiten zu beeinflussen, sondern eher die Aktivität des vereinigten Enzymkomplexes. Es ist wahrscheinlich, dass Rac modulierend auf ein oder mehrere Proteine der NADPH-Oxidase einwirkt und somit die Aktivität des Enzyms durch eine Interaktion von Rac mit p67*phox* und p47*phox* steigert (Abo and Pick, 1991).

Die NADPH-Oxidase katalysiert in gesunden neutrophilen Granulozyten die Bildung von Superoxid-Anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) aus Sauerstoff, wobei NADPH aus dem Hexosemonophosphatweg als Elektronendonator dient. Das gebildete Superoxid-Anion wird durch Superoxiddismutase (SOD) oder spontan in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> überführt. Dort kann das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in mehrere verschiedene Stoffwechselwege einmünden (Segal et al., 2000). Die vaskulären NAD(P)H-Oxidasen zeigen jedoch funktionelle Unterschiede zum granulozytären Enzym. In Granulozyten ist die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase schnell induzierbar ("oxidative burst"), während in vaskulären Zellen die O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-Bildung auf eher niedrigem konstitutiven Niveau erfolgt (Hohler et al., 2000). Als Elektronendonator wird in Granulozyten NADPH bevorzugt (Curnutte et al., 1987), während in Lysaten vaskulärer Zellen die ROS-Bildung stärker durch NADH stimuliert wird (Mohazzab et al., 1994; Griendling et al., 1994).



**Abb. 1.3:** Dieses Modell zeigt den Übergang vom ruhenden in den aktivierten Multienzymkomplex NADPH Oxidase. Die zentrale Komponente ist das transmembranöse Flavocytochrome  $b_{558}$ , das aus den Bausteinen *gp91phox*, *p22phox* und dem Flavocytochrom *Rap1A* besteht. Die zytosolischen Komponenten bestehen aus den Proteinen *p47phox*, *p67phox*, *p40phox* und *Rac2*, wobei die Proteine *p47phox*, *p67phox* und *p40phox* einen gemeinsamen Komplex bilden, der nach der Aktivierung als ein Ganzes zur Plasmamembran transloziert und sich dort mit den membranständigen Komponenten bindet. *Rac2* ist im Zytosol an einen Guanine Nukleotid Austauschfaktor (GDI) gebunden. Während der Aktivierung kommt es zur Separation der beiden Komponenten, und *Rac2* transloziert simultan und unabhängig von den anderen zytosolischen Komponenten zur Plasmamembran. Der Multienzymkomplex katalysiert die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu  $O_2^-$ , wobei NADPH als Reduktionsmittel dient (abgewandelt nach DeLeo and Quinn, 1996).

In den letzten Jahren konnten in den verschiedenen humanen Körperzellen *gp91*-Homologe nachgewiesen werden. Nach Einführung einer einheitlichen Nomenklatur wird *gp91* nun auch als NOX 2 (NADPH-Oxidase 2) bezeichnet. In glatten Muskelzellen und in Kardiomyozyten wurden zu *gp91phox* homologe Proteine, MOX 1 (mitogen activated oxidase 1) oder NOX 1 und NOX 4, nachgewiesen, die eine NADPH-Oxidase ähnliche ROS-Bildung vermitteln (Shiose et al., 2001; Sorescu et al., 2004; Suh et al., 1999). Sowohl NOX 1 als auch NOX 4

werden durch Angiotensin II induziert. NOX 3 wurde in der embryonalen Niere gefunden (Lambeth, 2004), NOX 5 im Hoden, in der Milz und in Lymphknoten und DUOX 1 und 2, die eine zusätzliche Peroxydase Domäne besitzen, in Schilddrüse, Lunge und Darm (Krause, 2004; Harper et al., 2005).

### 1.5.2 ROS im kardiovaskulären System

ROS-vermittelter oxidativer Stress wird seit den 90er Jahren als Auslöser verschiedener Herz-Kreislaufkrankungen diskutiert. Es ist bekannt, dass ROS in Gefäßzellen als Mediatoren für die Öffnung von  $K^+$ -Kanälen wirken und eine Vasodilatation durch Bradykinin und andere Endothel-abhängige relaxierende Agonisten hervorrufen können. Indem sie als sekundäre Botenstoffe für Wachstumsfaktoren wie Angiotensin II und den Plättchen-assoziierten Wachstumsfaktor (PDGF) agieren, regulieren ROS Zellwachstum und -teilung (Sundaresan et al., 1995). Unter pathophysiologischen Bedingungen können ROS Zellschäden und Dysfunktionen hervorrufen. Die Wirkung hängt von der Quelle und Menge der ROS in der Zelle ebenso wie vom gesamten Redoxstatus der Zelle ab.

Eine häufige Herzerkrankung ist die Hypertrophie, ein Kompensationsmechanismus des Herzens, um veränderten Bedingungen entgegen zu wirken. Es gibt verschiedene Stimuli für eine Herzhypertrophie, z.B. mechanischen Stress, neurohormonale Stimuli wie Angiotensin II, Endothelin I und Norepinephrin (Sadoshima and Izumo, 1993; Sugden, 2003; Lassegue et al., 2001). In glatten Gefäßmuskelzellen des Herzens wurde gezeigt, dass  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$  und  $OH^{\cdot}$  hypertroph wirken können (Griendling et al., 2000).

Als eine wichtige molekulare Quelle von ROS im Herz-Kreislaufsystem wurde die NADPH-Oxidase (NOX) identifiziert. Ihre Enzymaktivitäten sind bei arterieller Hypertonie und koronarer Herzkrankheit hochreguliert. Beim Menschen wurde eine Korrelation zwischen der vaskulären NOX-Aktivität und dem atherosklerotischen Risikoprofil einerseits und gestörter  $^{\cdot}NO$ -vermittelter Funktionen andererseits nachgewiesen (Sorescu et al., 2002). Als Regulatoren der NOX-Expression wurden neben Angiotensin II auch oxidiertes LDL und Hyperglykämie identifiziert, nicht aber Endothelin I. Insuffizientes humanes Myokard exprimiert vermehrt NOX 1, ein Effekt, der unter Therapie mit ACE-Hemmern umkehrbar ist.

Neben dieser pathophysiologischen Induktion kommen alle NOX-Isoenzyme auch unter physiologischen Bedingungen vor. Jedoch sind die physiologischen Funktionen vaskulärer NOX-Isoformen weitestgehend unklar. Möglich wären hier ein tonischer proliferativer Stimulus auf Endothel- und glatte Muskelzellen sowie ein sogenannter chemischer Barorezeptorreflex gegen überschießende Mengen an  $\cdot\text{NO}$ .

Endotheliales Stickstoffmonoxid ( $\cdot\text{NO}$ ) stellt einen der wichtigsten akuten und chronischen protektiven Signalstoffe im Blutgefäßsystem dar. Ein relativer Mangel an  $\cdot\text{NO}$  geht mit verstärkter Thrombusbildung, Vasokonstriktion und glattmuskulärer Proliferation einher, der so genannten endothelialen Dysfunktion. Als eine wichtige Ursache hierfür wurde unter anderem ein vermehrter  $\cdot\text{NO}$ -Abbau durch ROS wie Superoxid ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) identifiziert. Bei der Reaktion von  $\text{O}_2^{\cdot-}$  mit  $\cdot\text{NO}$  entsteht Peroxynitrit ( $\text{OONO}\cdot$ ), eine potentiell schädliche ROS.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Studie wurden die Mechanismen der Proliferation von Kardiomyozyten differenziert aus embryonalen Stammzellen und neonatalen Zellen der Maus untersucht. Hierbei sollten folgende Fragestellungen geklärt werden:

1. Wie lange proliferieren die Kardiomyozyten nach Isolation?
2. Inwieweit wird die Kardiomyozytenproliferation durch ROS beeinflusst?
3. Werden mögliche Effekte durch Radikalfänger inhibiert?
4. Inwieweit wird die NADPH-Oxidase in EBs und Kardiomyozyten exprimiert?
5. Stimulieren ROS die Kardiomyogenese embryonaler Stammzellen?
6. Wird durch exogen appliziertes  $H_2O_2$  die ROS-Freisetzung beeinflusst?
7. Welchen Einfluss haben ROS auf die Expression kardialer Transkriptionsfaktoren und herzspezifischer Gene?



## 3 Material

### 3.1 Firmen

1. Abcam Limited, Cambridge CB4 OTP, Cambridgeshire, UK
2. Alexis, 35305 Grünberg, Deutschland
3. Ambion Europe Ltd, Huntington Cambridgeshire, Großbritannien
4. Amersham Biosciences Europe GmbH, 79111 Freiburg, Deutschland
5. Becton Dickinson GmbH, 69126 Heidelberg, Deutschland
6. Biochrom, 12247 Berlin, Deutschland
7. Biorad GmbH, 80901 München, Deutschland
8. Biozym Scientific GmbH, 31833 Oldendorf, Deutschland
9. Bühler, 72379 Hechingen, Deutschland
10. Calbiochem-Novabiochem GmbH, 65796 Bad Soden, Deutschland
11. Cell Signaling, 159 J Cummings Center Beverly, MA 01915
12. Chemicon International, Hampshire SO53 4NF, UK
13. Dianova, 20354 Hamburg, Deutschland
14. Dunn Labortechnik, 53567 Asbach, Deutschland
15. Eppendorf, 22339 Hamburg, Deutschland
16. Gilson International B.V., 65520 Bad Camberg, Deutschland
17. Greiner Bio-One GmbH, 72636 Frickenhausen, Deutschland
18. Heidolph Elektro GmbH, 93309 Kelheim, Deutschland
19. Heraeus Instruments, 63452 Hanau, Deutschland
20. Hirschmann® Laborgeräte, 74246 Eberstadt, Deutschland
21. Integra Biosciences, 35463 Fernwald, Deutschland
22. Invitrogen, 76131 Karlsruhe, Deutschland
23. Kendro Laboratory Products, 63505 Langenselbold, Deutschland
24. Labnet International Inc., Windsor, Berkshire, United Kingdom
25. Langenbrick, 79312 Emmendingen, Deutschland
26. Leica, 64625 Bensheim, Deutschland
27. Menzel-Gläser, 38116 Braunschweig, Deutschland
28. Merck, 64293 Darmstadt, Deutschland
29. Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA

30. New England Biolabs, Beverly, MA 01915-5599, USA
31. Paesel-Lorei Vertriebs- und Marketing GmbH, 63452 Hanau, Deutschland
32. Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, Deutschland
33. Roth, 76231 Karlsruhe, Deutschland
34. PAA, 35091 Cölbe, Deutschland
35. Promega, 68199 Mannheim, Deutschland
36. Santa Cruz Biotechnologie Inc., Santa Cruz California, USA
37. Sartorius, 37075 Goettingen, Deutschland
38. Schülke-Mayr-GmbH, 22851 Norderstedt
39. Serva, 69115 Heidelberg, Deutschland
40. Sigma (-Aldrich), 82024 Taufkirchen, Deutschland
41. Techne Progene, 97877 Wertheim-Bestenheid, Deutschland
42. Zeiss, 07745 Jena, Deutschland

### ***3.2 Geräte und Laborbedarf***

bakteriologische Schalen:	Greiner
Cellspin Rührsystem:	Integra
Deckgläschen:	Roth
Gewebekulturschalen:	Falcon, Greiner
FACS Calibur <sup>TM</sup> :	Becton Dickinson
ICycler:	Bühler
Immersionsöl:	Roth
Inkubatoren:	HERAcell® 240, Kendro
Konfokales Lasermikroskop:	Leica
Lichtmikroskop:	Zeiss
Objektträger:	Roth
Röhrchen 15ml und 50ml:	Greiner
Petriperm-Schalen:	Greiner
pH-Meter digital:	Sartorius
Pipetten:	Pipetus®-standard von Hirschmann® , Glaspipette von Roth, Plastikpipetten von Becton Dickinson
Schüttler (ProBlot 25XLD Rocker)	Labnet International

---

Spinnerflaschen:	CELLspin 240, Integra
Sterilbank:	Heraeus
ThermoCycler:	Techne
Vortexer:	Heidolph
Wasserbad:	Hirschmann
Zellkulturplatten:	BD
Zentrifugen :	Centrifuge 5417C Eppendorf, Heraeus Labofuge 300, Heraeus Biofuge 15R

### ***3.3 Medien und Chemikalien***

Apocynin:	Calbiochem
Chloroform:	Merck
Collagenase:	Roche
Detergent 7x:	Serva
DMSO:	Calbiochem
DNase I:	Invitrogen
DPI:	Sigma
dNTPs:	Invitrogen
Dulbecco's PBS ohne Ca&Mg:	PAA
EDTA:	Invitrogen
ESGRO® (LIF):	Chemicon
Ethidiumbromid:	Sigma
Fetal Bovine Serum (FBS):	Sigma
Ficoll-Paque Plus:	Amersham
Fluoromount-G™:	Paesel-Lorei
L-Glutamin 200mM (100x):	PAA
Glycerol:	Sigma
IMDM (basal Iscove's Medium):	Biochrom
MEM (50x) Aminosäuren:	Biochrom
Mitomycin C:	Sigma
β-Mercaptoethanol:	Sigma

---

MMLV RT:	Biorad
Natriumchlorid:	Roth
Natriumpyruvat (100mM):	Biochrom
NEA (100x):	Biochrom
NMPG:	Sigma
Penicillin/Streptomycin (100x):	PAA
Primer	Invitrogen
RNAlater ICE	Ambion
Sigmacote:	Sigma
SYBR Green Supermix:	Biorad
Sytox Green Kernfärbelösung:	Invitrogen
Trizol:	Invitrogen
Triton X-100:	Sigma
Trolox:	Sigma
Trypsin EDTA:	Invitrogen
Wasserstoffperoxid:	Sigma

### 3.4 Antikörper

#### Primäre Antikörper:

Anti- $\alpha$ -Aktinin monoklonal Maus (Klon EA-53)	Sigma
Anti-BrdU Ratte	Abcam
Anti-Cyclin D1 polyklonal Kaninchen	Chemicon
Anti-Ki-67 Ziege	Santa Cruz
Anti-MOX 1 (M-15) Ziege	Santa Cruz
Anti-NOX 4 (M-15) Ziege	Santa Cruz
Anti-p22 <sup>phox</sup> (C-17)	Santa Cruz
Anti-p47 <sup>phox</sup> Ziege	Santa Cruz
Anti-p27 <sup>KIP1</sup> polyklonal Kaninchen	Chemicon
Anti-p67 <sup>phox</sup> (H-300) Kaninchen	Santa Cruz
Anti-phospho-Rb (Ser 780) Kaninchen	Cell Signalling

#### Sekundäre Antikörper:

Cy 3 donkey anti-goat	Dianova
Cy 5 goat anti-rabbit	Dianova
Cy 5 goat anti-rat	Dianova
Cy 5 mouse anti-goat	Dianova
Cy 5 sheep anti mouse	Dianova
FITC goat anti-mouse	Sigma
FITC sheep anti-rabbit IgG	Sigma

### 3.5 Primer

Verwendete Primer:		5' $\longrightarrow$ 3'	Temperatur
ANP	forward	CGT GCC CCG ACC CAC GCC AGC ATG GGC TCC	60°C
ANP	reverse	GGC TCC GAG GGC CAG CGA GCA GAG CCC TCA	60°C
BACT	forward	GAT GAC CCA GAT CAT GTT TGA G	60°C
BACT	reverse	CCA TCA CAA TGC CTG TGG TA	60°C
BMP 10	forward	ACC AGA CGT TGG CAA AAG TCA GGC	63°C
BMP 10	reverse	GAT GAT CCA GGA GTC CCA CCC AAT	63°C
$\alpha$ -CA	forward	CCA GCC CAG CTG AAT CC	62°C
$\alpha$ -CA	reverse	CCA TTG TCA CAC ACC AAA GC	62°C
DTEF 1	forward	CCC GAA CGC TTT CTT CCT TGT C	62°C
DTEF 1	reverse	ACC TTG GTG GAG ACG CTG ATG	62°C
GAPDH	forward	TCG TCC GGT AGA CAA AAT GG	62°C
GAPDH	reverse	GAG GTC AAT GAA GGG GTC GT	62°C
GATA 4	forward	TCA AAC CAG AAA ACG GAA GC	60°C
GATA 4	reverse	GTG GCA TTG CTG GAG TTA CC	60°C
MEF 2C	forward	AGC CGG ACA AAC TCA GAC AT	62°C
MEF 2C	reverse	TAT TCC TCT GCA GAG ACG GG	62°C
$\beta$ -MHC	forward	CTA CAG GCC TGG GCT TAC CT	62°C
$\beta$ -MHC	reverse	TCT CCT TCT CAG ACT TCC GC	62°C
MLC 2a	forward	TCA GCT GCA TTG ACC AGA AC	60°C
MLC 2a	reverse	AAG ACG GTG AAG TTG ATG GG	60°C
MLC 2v	forward	AAA GAG GCT CCA GGT CCA AT	60°C
MLC 2v	reverse	CCT CTC TGC TTG TGT GGT CA	60°C
Nkx 2.5	forward	CCA CTC TCT GCT ACC CAC CT	62°C
Nkx 2.5	reverse	CCA GGT TCA GGA TGT CTT TGA	62°C
NOX 1	forward	AAT GCC CAG GAT CGA GGT	60°C
NOX 1	reverse	GAT GGA AGC AAA GGG AGT GA	60°C
NOX 4	forward	GAT CAC AGA AGG TCC CTA GCA G	62°C
NOX 4	reverse	GTT GAG GGC ATT CAC CAA GT	62°C

### 3.6 Medien, Puffer

#### 3.6.1 Medien

##### *Iscove´s modifiziertes DMEM (IMDM):*

IMDM unterstützt das Wachstum vieler verschiedener Säugerzellen und kann für das Wachstum undifferenzierter ES Zellen verwendet werden. Das in dieser Arbeit verwendete IMDM enthält neben Selen zusätzliche Aminosäuren, Vitamine, Natriumpyruvat und HEPES-Puffer.

Für die Kultivierung embryonaler Stammzellen ist fötales Rinderserum (FBS) notwendig. Ein Teil des Serums wurde durch Erhitzen bei 56° C für 35 min inaktiviert.

Zusammensetzung Iscove´s Medium mit 10% FBS für die Kultivierung der Feeder-Zellen:	Zusammensetzung Iscove´s Medium mit 20% FBS für die Kultivierung der EBs:
500 ml IMDM	500 ml IMDM
59 ml hitzeinaktiviertes FBS	132,5 ml nicht hitzeinaktiviertes FBS
6,25 ml Natrium-Pyruvat (100x)	6,25 ml Natrium-Pyruvat (100x)
6,25 ml NEA (100x)	6,25 ml NEA (100x)
6,25 ml MEM (100x)	6,25 ml MEM (100x)
3,5 ml $\beta$ -Mercaptoethanol (10 $\mu$ M)	3,5 ml $\beta$ -Mercaptoethanol (10 $\mu$ M)
6,25 ml L-Glutamin (100x)	6,25 ml L-Glutamin (100x)
1,5 ml Penicillin/Streptomycin (100x)	1,5 ml Penicillin/Streptomycin (100x)

##### *ESGRO® (Maus Leukämie-inhibierender Faktor)*

Bei ESGRO® handelt es sich um einen rekombinanten Leukämie-inhibierenden Faktor (LIF) aus der Maus, hergestellt in *E. coli*. Für die ES Zellkultur wurde LIF in der Konzentration 10<sup>3</sup> Einheiten/ml eingesetzt.

##### *Einfriermedium*

IMDM mit 10% FBS
DMSO 10%

### 3.6.2 Puffer

#### *Puffer zur Isolation der Kardiomyozyten (IK-Puffer)*

NaCl	7 g	119,78 mM
KCl	0,4 g	5,36 mM
MgSO <sub>4</sub>	1,23 g	4,99 mM
Na-Pyruvat	50 ml	5,00 mM
Glucose	3,96 g	19,98 mM
Taurin	2,5 g	19,98 mM
HEPES	2,38 g	9,99 mM

→ in 1 l Wasser gelöst und mit NaOH auf pH 6,9 eingestellt

#### *10 x PBS*

KCl	2 g	26,82 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g	14,70 mM
NaCl	80 g	1,37 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	12,5 g	64,61 mM

→ in 1 l Wasser gelöst und mit HCl auf pH 7,4 eingestellt



### 3.6.3 Substanzen

#### 3.6.3.1 Trolox

Trolox, ein synthetisches Analogon zu  $\alpha$ -Tocopherol, ist ein zellpermeables lipophiles Vitamin E-Derivat mit sehr guten Antioxidations-eigenschaften. Biologische Antioxidantien schützen Zellen vor unterschiedlichen Arten von oxidativen Schäden. Trolox stoppt die radikalische Kettenreaktion, indem es ein Wasserstoffatom seiner phenolischen Hydroxylgruppe auf das Peroxylradikal überträgt und dadurch selbst zum Vitamin E-Radikal wird. Dieses Radikal ist sehr reaktionsträge und kann durch Ascorbat inaktiviert werden (Wu et al., 1990).

#### 3.6.3.2 NMPG

Bei N-(2-Mercapto-propionyl)glycin (NMPG) oder Tiopronin handelt es sich um ein Thiol-Gemisch, das mit Cystein ein Disulfid bildet. Es handelt sich um eine antiperoxidierende, zytoprotektive und mukolytische Substanz, die den Gehalt von ROS in der Zelle herabsetzt, indem der Pool zelleigener Radikalfänger erhöht wird. NMPG dient als Substrat für die Glutathion-Transferase (De Flora et al., 1991).

#### 3.6.3.3 Apocynin

Apocynin, ein potenter und spezifischer Inhibitor der NADPH-Oxidase-vermittelten ROS-Bildung, verhindert die Translokation der zytosolischen Komponenten der NADPH-Oxidase. Das aus dem Wurzelextrakt der Arzneipflanze *Picrorhiza kurroa* isolierte zellpermeable Katechol hemmt sowohl die intra- als auch die extrazelluläre ROS-Produktion (van den Worm et al., 2001).

#### 3.6.3.4 Diphenylen Iodonium Chlorid (DPI)

Ein weiterer zellpermeabler Hemmstoff der NADPH-Oxidase ist der Flavoenzym-bindende Inhibitor DPI. Zudem hemmt DPI irreversibel die endotheliale Stickstoff-Synthase (eNOS) (O'Donnell et al., 1993).

## 4 Methoden

### 4.1 Zellkultur embryonaler Stammzellen

Die ersten pluripotenten Stammzelllinien der Maus wurden 1981 etabliert (Evans and Kaufmann, 1981; Martin, 1981). Bei allen in dieser Arbeit beschriebenen Experimente mit Stammzellen der Maus wurden Zellen der Linie CCE S103 verwendet, die 1986 von der Arbeitsgruppe Robertson et al. direkt aus Mäuseembryonen isoliert wurden. Die Stammzellen können als Einzelzellen bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff über Jahre gelagert werden.

Für die Kultivierung der verwendeten embryonalen Stammzellen (ES Zellen) der Linie CCE sind inaktivierte embryonale Fibroblasten (Feeder-Zellen, Ammenzellen) notwendig. Sie versorgen die ES Zellen mit wichtigen Nährstoffen und verhindern durch Abgabe bestimmter Stoffe (z.B. LIF) eine spontane Differenzierung der ES Zellen und eine spontane Adhärenz. Die zusätzlich zugeführte Menge an LIF über das Medium verstärkt diesen Effekt noch. Bei den ES Zellen wurde während der Anzucht auf Feeder-Zellen täglich Medium gewechselt.

#### 4.1.1 Feeder-Zellen

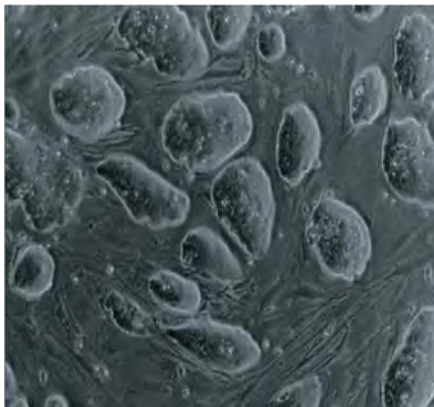
Die Fibroblasten wurden in einer Zelldichte von  $9 \times 10^4$  Zellen auf Gewebekulturschalen ausplattiert und bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  für 2 Tage in IMDM mit 10% FBS inkubiert. Die konfluenten Feeder-Zellen wurden mit Mitomycin-haltigem Medium inaktiviert, um eine weitere Proliferation zu verhindern. Dafür wurden die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen und anschließend für 2 bis 2,5 h mit 3 ml Mitomycin C ( $10 \mu\text{g/ml}$  IMDM mit 10% FBS) bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt, die inaktivierten Feeder-Zellen wurden maximal eine Woche aufbewahrt.

Mitomycin C ist ein antibiotisch wirkendes Zytostatikum, das aus *Streptomyces caespitosus* gewonnen wird. Es verhindert die Synthese der DNA, indem es zwischen 2 DNA-Strängen interkaliert, diese kovalent bindet und dadurch eine Dissoziation der DNA-Stränge verhindert. Auf diesem Weg unterbindet es die weitere Replikation der Zellen.

## 4.1.2 Stammzellen

### 4.1.2.1 Kultivierung der ES Zellen auf Feeder-Zellen:

Die ES Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in 5 ml IMDM mit 10% FBS für 5 min bei 65 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml IMDM mit 10% FBS vorsichtig resuspendiert; davon wurden 200 µl auf eine Zellkulturschale mit mitotisch inaktivierten Feeder-Zellen verteilt und mit 5 ml LIF-haltigem Medium inkubiert. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchte von 95% kultiviert.



**Abb. 4.1:** konfluente Stammzellen auf Feeder-Zellen

### 4.1.2.2 Passagieren der ES Zellen, Ansetzen einer Spinnerflasche:

Die ES Zellen wurden alle 2 - 3 Tage auf neue Feeder-Zellen umgesetzt, man spricht von einer Passage. Das Passagieren der ES Zellen muss bei 70% Konfluenz erfolgen, da eine zu hohe Dichte zu Stress und eventuellen Differenzierungsprozessen führt. Um die konfluenten Zellen in Einzelzellsuspension zu bringen, wurde das proteolytische Agens Trypsin-EDTA verwendet. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, für 3 - 5 min bei 37°C mit 1 ml 0,2% Trypsin und 0,05% EDTA inkubiert und anschließend mit einer Pipette vorsichtig vereinzelt. Daraufhin wurde die Trypsin-Reaktion mit 5 ml serumfreiem IMDM abgestoppt; 200 µl der Stammzellsuspension wurden auf die vorbereiteten inaktivierten Feeder-Zellen mit LIF-haltigem Medium verteilt und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchte von 95% inkubiert.

Die Stammzellen wurden in einer Dichte von  $3 \times 10^6$  Zellen in silikonisierte Spinnerflaschen (250 ml) überführt, die mit 125 ml IMDM mit 20% FBS gefüllt waren. Nach 24 h wurden die

Flaschen auf ein Endvolumen von 250 ml aufgefüllt. Etwa 150 ml Medium wurden täglich gewechselt.

Die Zellen in den Spinnerflaschen wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchte von 95% auf einem Magnetrührer mit 20 Umdrehungen pro Minute und Richtungswechsel nach jeweils vier Umdrehungen in gleichmäßiger Bewegung gehalten. Dadurch wurde neben der Vermeidung einer Adhärenz der Zellen ein konstanter Ausgleich von Temperatur und Nährstoffverteilung sichergestellt. Die Flaschen wurden mit leicht geöffnetem Deckel inkubiert, um einen Gasaustausch mit der Umgebungsluft zu garantieren.



**Abb. 4.2:** System der Spinnerflaschen

ES Zellen haben eine ausgeprägte Affinität zueinander und bilden spontan Aggregate, die so genannten Embryonalkörperchen (EBs).

ES Zellen differenzieren bei ausreichender Dichte und in Abwesenheit von LIF spontan zu verschiedenen Zelltypen aller drei Keimblätter, wie z.B. Blut-, Endothel-, Skelettmuskel- und Herzmuskelzellen. Diese Eigenschaft kann genutzt werden, um die Expression bestimmter Gene während dieses Differenzierungsprozesses zu untersuchen.

Aus den Spinnerflaschen wurden nach 4 Tagen EBs entnommen und auf Zellkulturschalen ausplattiert, zur Untersuchung verschiedener Fragestellungen der Differenzierungsprozesse und um spontan kontrahierende Areale zu erhalten.

#### **4.1.2.3 Einfrieren der ES Zellen:**

Sobald die ES Zellklone ausreichend dicht gewachsen waren, wurden sie wie zuvor beschrieben trypsiniert und zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 3 ml Einfriermedium resuspendiert, je 1 ml der Suspension in ein eiskaltes Kryoröhrchen überführt und bei -60° C eingefroren. Nach 24 h wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt, wo sie gelagert wurden.

## ***4.2 Gewinnung der Kardiomyozyten***

### **4.2.1 Isolation embryonaler Kardiomyozyten aus Stammzellen:**

Die Gewinnung einzelner Kardiomyozyten erfolgte nach einem modifizierten Verfahren von Isenberg und Klöckner (1982). Die kontrahierenden Areale der in Zellkulturschalen festgewachsenen EBs wurden an Tag 8 (4 Tage nach dem Ausplattieren) mit einer sterilen Kanüle unter dem Mikroskop ausgeschnitten, in Isolationspuffer für Kardiomyozyten (IK-Puffer) überführt, und nach einmaligem Waschen mit 1 - 2 mg Kollagenase B pro ml IK-Puffer versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C auf einem Schüttler wurden die Zellen abzentrifugiert (230 x g für 5 min) und mit IMDM resuspendiert. Die isolierten Zellen wurden auf sterile Deckgläschen in Zellkulturplatten (Multiwell™ 24-well) ausplattiert und wie unter den zuvor beschriebenen Bedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, täglicher Mediumwechsel) kultiviert.

### **4.2.2 Isolation neonataler Kardiomyozyten:**

Neonatale Mäuse wurden im Alter von 3 Tagen durch Dekapitation getötet. Nachdem das Herz herausgenommen und sofort in eiskaltes PBS gelegt worden war, wurden die Atrien und die großen Gefäße entfernt. Die Ventrikel wurden in 1 - 3 mm große Stücke geschnitten und in IK-Puffer mit Kollagenase bei 37°C für 20 min auf dem Schüttler inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei 230 x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in IMDM mit 20% FBS resuspendiert. Der Rest der Zellen wurde nochmals mit IK-Puffer und Kollagenase aufgefüllt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Dieser Schritt wurde fünfmal wiederholt, um möglichst viele Kardiomyozyten zu gewinnen. Die Zellsuspension wurde nach dem Verdau mit Kollagenase mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll® bei 180 x g für 25 min zentrifugiert, um eine größere Reinheit der Kardiomyozyten zu erzielen. Das Pellet wurde in Medium resuspendiert und in eine Zellkulturschale gegeben. Da andere Zellen schneller adhären werden als Kardiomyozyten, wurde der Überstand nach 10 min abgenommen und mit einer Dichte von 3 Kardiomyozyten pro mm<sup>2</sup> auf Deckgläschen ausplattiert (Wright et al., 2002; Reinecke et al., 1999).

### ***4.3 Behandlung der Zellen mit verschiedenen Substanzen***

Um den Effekt verschiedener Substanzen auf die Differenzierung der Zellen zu untersuchen, wurden 4 Tage alte EBs in Zellkulturschalen oder bakteriologischen Schalen für 2 h mit den Radikalfängern Trolox (100  $\mu\text{M}$ ) bzw. NMPG (100  $\mu\text{M}$ ) und den NADPH-Oxidase-Inhibitoren Apocynin (10  $\mu\text{M}$ ) bzw. Diphenylen Iodonium Chlorid (DPI, 100 nM) in IMDM vorinkubiert. Anschließend wurden die EBs für 24 h mit 500 nM  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt.

Die isolierten Kardiomyozyten wurden ebenfalls nach 4 Tagen für 2 h mit Radikalfängern oder NADPH-Oxidase-Inhibitoren vorinkubiert und anschließend für 24 h mit 100 nM  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt.

Bei proliferierenden Zellen wird Bromodeoxy-Uridin (BrdU) anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut. Die isolierten Kardiomyozyten wurden einen Tag vor der Fixierung (an Tag 0, 2, 4, 7 oder 10) für 24 h mit 100  $\mu\text{M}$  BrdU inkubiert, um den Einbau des Uridins in die DNA zu ermöglichen.

Die Behandlung mit BrdU und  $\text{H}_2\text{O}_2$  erfolgte gleichzeitig an Tag 4.

### ***4.4 Immunzytochemische Färbungen***

Vor der Fixierung wurden die auf den Deckgläschen festgewachsenen Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann mit eiskaltem 100% -igem Methanol für mindestens 20 min bei  $-20^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 0,1% PBST gewaschen.

Nach 20-minütiger Permeabilisierung mit 1% -igem PBST erfolgte das Blocken der unspezifischen Bindungen mit 10% -igem Milchpulver in 0,01% -igem PBST für 45 min bei Raumtemperatur.

Die Kardiomyozyten wurden auf den Deckgläschen mit dem Primärantikörper in der Lösung zum Blocken für 45 min oder über Nacht (siehe Tabelle) inkubiert. Danach wurden die Proben 4 - 5 mal mit 0,01% -igem PBST gewaschen, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, und anschließend mit dem Sekundärantikörper (in 10% -igem Milchpulver in 0,01% -igem PBST) für 45 min in einem dunklen Raum bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden wieder 4 - 5 mal mit 0,01% -igem PBST gewaschen.

Im Falle einer Doppelfärbung erfolgte die Färbung mit dem zweiten Primärantikörper und dem entsprechenden Sekundärantikörper nach dem gleichen Protokoll.

Die Proben wurden in 0,01% -igem PBST bei 4°C gelagert und anschließend in Mikroskopierkammern untersucht.

Die Färbung mit dem Kernfarbstoff Sytox Green (1 : 10 000 in 10% -igem Milchpulver in 0,01% -igem PBST) erfolgte an fixierten Zellen für 10 min bei Raumtemperatur.

<b>Primäre Antikörper</b>	<b>gewonnen aus</b>	<b>Inkubationsdauer</b>	<b>Konzentration</b>
Anti- $\alpha$ -Aktinin	Maus	45 min	1:200
Anti-BrdU	Ratte	45 min	1:100
Anti-Cyclin D1	Kaninchen	über Nacht	1:50
Anti-Ki-67	Ziege	über Nacht	1:20
Anti-MOX 1	Ziege	über Nacht	1:50
Anti-NOX 4	Ziege	über Nacht	1:50
Anti-p22 $phox$	Ziege	über Nacht	1:50
Anti-p27 <sup>Kip1</sup>	Kaninchen	45 min	1:200
Anti-p47 $phox$	Ziege	über Nacht	1:50
Anti-p67 $phox$	Kaninchen	über Nacht	1:200
Anti-phospho-Retinoblastom	Kaninchen	45 min	1:200
<b>Sekundäre Antikörper</b>			
<b>Sekundäre Antikörper</b>	<b>gewonnen aus</b>	<b>Inkubationsdauer</b>	<b>Konzentration</b>
Cy 3 anti-Ziege	Esel	45 min	1:200
Cy 5 anti-Kaninchen	Ziege	45 min	1:200
Cy 5 anti-Maus	Schaf	45 min	1:200
Cy 5 anti-Ziege	Maus	45 min	1:200
FITC anti-Kaninchen	Schaf	45 min	1:200
FITC anti-Maus	Ziege	45 min	1:200

#### ***4.5 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)***

Die Messung intrazellulärer ROS wurde mit dem niedermolekularen Fluoreszenzfarbstoff 2'-7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diazetat (H<sub>2</sub>DCF-DA) durchgeführt. Das unpolare, nicht fluoreszierende, lipophile Diazetat diffundiert passiv in die Zelle, wo durch intrazelluläre Esterasen die Azetat-Gruppen abgespalten werden. Dadurch entsteht das polare, zellimpermeable H<sub>2</sub>DCF. Durch intrazelluläre ROS wird das nicht fluoreszierende H<sub>2</sub>DCF sehr schnell zu der stark fluoreszierenden Form DCF (Dichlorofluorescein) oxidiert.

In den Experimenten wurden die EBs 24 h nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in serumfreiem Medium für 20 min mit 20 µM H<sub>2</sub>DCF-DA behandelt. Nach Waschen mit 1 x PBS wurde die DCF-Fluoreszenz im 488 nm Frequenzbereich des Argonlasers mit dem konfokalen Lasermikroskop angeregt. Die Emission wurde mit einem LP 515 nm Filter gemessen. Die Intensität der grünen Fluoreszenz des DCF gilt als Indikator für die endogene, intrazelluläre Radikalproduktion.

#### ***4.6 Konfokale Lasermikroskopie***

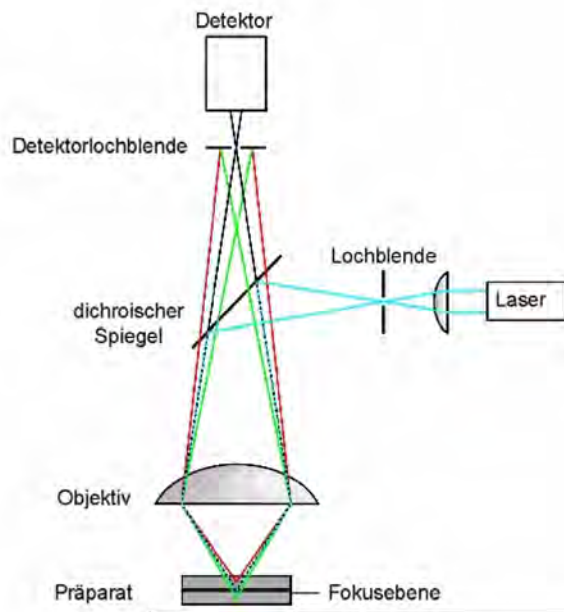
Fluoreszierende Substanzen absorbieren Licht definierter Wellenlängen, wodurch bestimmte Elektronen aus dem Grundzustand in einen angeregten, energiereicheren Zustand übergehen. Beim Übergang in den Grundzustand wird ein Teil der aufgenommenen Energie in andere Energieformen, z.B. Wärme, umgewandelt, während der restliche Teil der Energie als Fluoreszenzlicht emittiert wird (Schild, 1996; Haugland, 1996). Das Fluoreszenzlicht ist grundsätzlich energieärmer und somit langwelliger als das Anregungslicht. Werden die anregende Wellenlänge und -stärke konstant gehalten, ist die Anzahl der emittierten Photonen linear zur Anzahl der vorhandenen Fluoreszenzmoleküle. Die Intensität des Fluoreszenzlichts kann durch eine photosensitive Vorrichtung gemessen werden, z.B. durch einen Photomultiplier (PMT), eine einfache photoelektrische Zelle mit eingebautem Verstärker.

Konfokale Mikroskope werden benutzt, um klare Tiefenschnitte von dreidimensionalen Proben zu erlangen, ohne die Proben zu zerstören. *Abb. 4.6* zeigt schematisch den Strahlengang eines konfokalen Mikroskops. Die Bestrahlung eines Gegenstandspunktes dauert nur wenige Millisekunden, und eine starke Lichtquelle, in der Regel ein Laser, ist



notwendig, um ausreichend Fluoreszenz anzuregen. Alle anderen Punkte werden während dieser Zeit nicht bestrahlt und können daher auch nicht gebleicht oder verändert werden.

Bei der Fluoreszenzmikroskopie können Anregungs- und Emissionslicht durch geeignete Filter und dichroische Spiegel voneinander getrennt werden, so dass zwar das kurzwellige Anregungslicht auf das Präparat trifft, aber nur das langwellige Emissionslicht zum Okular, Photomultiplier oder zur Kamera geleitet wird.



**Abb. 4.3:** Vereinfachter Strahlengang eines konfokalen Mikroskops. Das Licht einer punktförmigen Lichtquelle (Laser, Linse und Lochblende) wird über einen dichroischen Spiegel in den Strahlengang des Mikroskops eingebracht und durch das Objektiv in das Präparat fokussiert. Reflektiertes oder Fluoreszenzlicht aus der Fokusebene (schwarz) wird durch das Objektiv und die Detektorlochblende (pinhole) von einem Detektor (z.B. ein Photomultiplier) aufgenommen. Licht aus Ebenen über (rot) oder unter (grün) der Fokusebene wird durch die Detektorlochblende abgeschirmt.

Das Prinzip der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie resultiert in einer deutlichen Erhöhung des Kontrastes und einem wesentlich geringeren Anteil an störender Fluoreszenz. Durch die Lochblende wird ein Bild von sehr geringem Ausmaß, in der Regel weniger als  $1 \times 1 \mu\text{m}$  des Gegenstandes, abgebildet. Das aus der Lochblende austretende Licht wird von einem Photomultiplier detektiert, die Information wird von einem nachgeschalteten Computer aufgezeichnet. Die automatische Rastereinrichtung des konfokalen Mikroskops richtet den

Strahlengang des Anregungs- und Emissionslichtes auf benachbarte Gegenstandspunkte in der Fokusebene aus (Ablenkung in der x/y-Achse). Das erhaltene Bild gibt die Fluoreszenzintensitäten innerhalb der Fokusebene wieder. Da dieses Bild nur geringfügig Informationen aus anderen Ebenen als der Fokusebene beinhaltet, wird es auch „optischer Schnitt“ genannt. Durch Heben bzw. Senken des Objektisches des Mikroskops können optische Schnitte aus mehreren, aufeinanderfolgenden Ebenen (z-Ebene) aufgenommen werden. Dadurch wird die räumliche Ausdehnung des Präparats aufgelöst und kann mittels geeigneter Computerprogramme verdeutlicht werden.

Konfokale Mikroskope nutzen spezifische Wellenlängen des Lichts, um fluoreszierende Moleküle in einer Probe anzuregen. Es wurde mit dem Krypton/Argon-Laser mit den Wellenlängen 458/488 nm und den Helium/Neon-Lasern 568 nm und 647 nm gearbeitet.

Folgende Fluoreszenzfarbstoffe wurden verwendet:

<b>Fluoreszenzfarbstoff</b>	<b>Absorption (nm)</b>	<b>Emission (nm)</b>
Cy 3	514, 552, 554	566, 570
Cy 5	649	666, 670
FITC	490, 494	520, 525

Die Bilder wurden mit einem Computerprogramm (Scanware, Leica) aufgenommen und mit Hilfe der Leica Confocal Software TCS SP2 ausgewertet.

## **4.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Um die Transkription eines Genes nachzuweisen, muss die abgelesene RNA untersucht werden. Zunächst wird durch eine reverse Transkription (RT) die mRNA in cDNA umgeschrieben. Die cDNA kann im Anschluss als Ausgangsprodukt in der PCR verwendet werden, um spezifische Sequenzen zu amplifizieren.

Bei der Real-Time-PCR wird die DNA gleichzeitig amplifiziert und quantifiziert. Häufig wird die Real-Time-PCR mit der RT-PCR kombiniert, um die relative Genexpression zu einer bestimmten Zeit oder in einem bestimmten Zell- oder Gewebetyp zu quantifizieren. Man bezeichnet dies als quantitative RT-PCR.

### **4.7.1 Isolation der RNA**

Zur RNA-Isolation wurden die EBs nach dem Waschen mit 1 ml eiskaltem Trizol für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach vollständiger Auflösung der Zellen mit Hilfe eines Vortex-Schüttlers wurde die Suspension mit 200 µl Chloroform versetzt und gut durchmischt, so dass sie weiß erschien. Nach einer Inkubationszeit von 2 min bei Raumtemperatur wurde die gesamte RNA durch eine Zentrifugation (11000 x g) für 20 min bei 4°C von DNA und Proteinen getrennt. Zu erkennen war die Auftrennung an der Bildung von insgesamt 3 Phasen, wobei die obere klare Phase die gesamte RNA enthielt, während in der mittleren Phase Proteine und in der unteren gelblichen Phase DNA gelöst waren. Die obere Phase wurde vorsichtig abpipettiert, nochmals mit 200 µl Chloroform versetzt und zentrifugiert, um eine höhere Reinheit der RNA zu erhalten. Zur Fällung der RNA wurde die obere Phase nun mit 500 µl eiskaltem Isopropanol für mindestens 20 min bei -20°C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (20 min bei 11000 x g und 4°C) wurde die gefällte RNA in einem Pellet gewonnen. In einem weiteren Schritt wurde die RNA mit 70% -igem Ethanol gewaschen und für 5 min bei 4°C und 4500 x g zentrifugiert. Die im Pellet enthaltene RNA wurde getrocknet und in etwa 30 µl sterilem RNase-freiem Wasser resuspendiert.

Um die Reinheit der isolierten RNA weiter zu erhöhen und eine Amplifikation von noch in der Probe vorhandenen genomischen Sequenzen zu verhindern, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. DNase I ist eine unspezifische Endonuklease, die doppel- und einzelsträngige DNA und Chromatin abbaut. Die in Wasser gelöste RNA wurde mit 10 Einheiten RNase-

freier DNase I, 50 mM Tris pH 7,5, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT und 1 Einheit/μl RNAsin bei 37°C für eine h inkubiert und mit 150 μl RNase-freiem Wasser und 200 μl Phenol/Chloroform (1:1) für 10 min bei 4°C und 14000 x g gewaschen. Danach wurde die obere Phase nochmals mit 200 μl Chloroform zentrifugiert und die RNA in der dabei entstandenen oberen Phase mit 20 μl 3 M Natriumazetat und 500 μl absolutem Ethanol gefällt. Das entstandene Pellet wurde mit 70% -igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in etwa 15 μl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

Nach der RNA-Isolierung wurde die RNA-Konzentration quantitativ photometrisch in einem Spektrophotometer bestimmt. Hierzu wurde 1 μl der RNA-enthaltenden Lösung entnommen, in 1 ml sterilem Wasser aufgenommen, in eine Quarzglasküvette überführt und bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen.

Die restliche Lösung wurde zur Synthese der cDNA durch die Reverse Transkriptase entweder sofort verwendet oder tiefgefroren gelagert.

#### **4.7.2 cDNA-Synthese**

cDNA (complementary DNA) wird verwendet, um ohne Introns mit einem Gen oder Teilen eines Gens zu arbeiten. cDNA ist reiner und stabiler als RNA.

Bei der Reversen Transkription mit einem Oligo-dT Primer wurden 2 μg RNA pro Ansatz zur cDNA-Synthese eingesetzt, wobei diese Menge mit sterilem RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 μl aufgefüllt wurde. Die RNA in diesen 10 μl wurde im ThermoCycler für 15 min bei 60°C denaturiert und anschließend für 1 min bei 4°C gekühlt. Ein Mix, der 4 μl 5' Reverse-Transkription-Puffer, 1 μl DTT (0,1 M), 1 Einheit/μl RNAsin, 2 μl dNTPs (0,1 mM), 2 μl Oligo-dT (10 μM) und 1 μl MMLV RT (reverse Transkriptase, 200 Einheiten/μl) enthielt, wurde hinzugefügt. Die Reverse Transkription erfolgte für 1 h bei 37°C im ThermoCycler, mit anschließender Denaturierung der gebildeten cDNA für 5 min bei 94°C, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Bis zur späteren Verwendung wurden die Proben bei -20°C tiefgefroren.

### 4.7.3 Quantitative PCR

In der PCR werden die gewonnenen cDNA-Abschnitte amplifiziert. Das Signal steigt direkt proportional zur Menge des PCR-Produkts in einer Reaktion. Die Detektion und Quantifizierung erfolgt mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes, dessen Emission in jedem Zyklus gemessen wird. Es sind verschiedene Chemikalien für die Real-Time-PCR erhältlich, die eine Detektion der PCR-Produkte durch Generierung eines fluoreszierenden Signals ermöglichen. SYBR® Green, der in dieser Arbeit verwendete Farbstoff, emittiert eine starke Fluoreszenz, wenn er an doppelsträngige DNA bindet.

Für die PCR wurden 3 µl cDNA und 17 µl des hergestellten PCR-Ansatzes, bestehend aus 6,4 µl Wasser, 0,3 µl Primer forward, 0,3 µl Primer reverse und 10 µl SYBR® Green PCR Supermix in einem sterilen Eppendorf-Gefäß gut gemischt und bei einer für den Primer spezifischen Zyklenzahl und Temperatur im iCycler bearbeitet.

Im iCycler wurden nun 3 Zyklen durchlaufen. Hierbei variierte die Annealingtemperatur in Abhängigkeit vom jeweiligen Primer.

Zyklus 1 (1x)		Aktivierung der Polymerase	93°C, 3 min
Zyklus 2 (45x)	Schritt 1	Denaturierung	93°C, 30 s
	Schritt 2	Annealing	primerspezifisch, 30 s
	Schritt 3	Amplifikation	72°C, 30 s
Zyklus 3 (100x)			50°C, 10 s

Die Daten wurden mit Hilfe der Biorad iCycler iQ Software analysiert. Die Anzahl der Zyklen, nach denen die PCR-Reaktion ihre exponentielle Phase erreichte, wurde mit dem Schwellenwert bei dem passenden „housekeeping“ Gen (BACT, 60°C und GAPDH 62°C - 63°C) verglichen. Dies wird als vergleichende Schwellenwert-Methode ( $\Delta\Delta C_T$  Methode) bezeichnet.

## 4.8 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie (flow cytometry) ist eine Technik, um mikroskopisch kleine Partikel, die in einer Flüssigkeit gelöst sind, zu zählen, zu untersuchen oder zu sortieren.

FACS, eine Form der Durchflusszytometrie, steht für **F**luorescence **a**ctivated **c**ell **s**orting und beschreibt ein Verfahren, das in der Biologie und in der Medizin zur Anwendung kommt. Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert.

In einer Lösung befindliche Zellen werden durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Die Zelle emittiert dabei Streulicht und, wenn Antikörper gebunden sind, Fluoreszenzimpulse, woraus man unterschiedliche Eigenschaften der Zelle ableiten kann. Das Streulicht wird durch Zellgröße, die Struktur der Zellwand sowie intrazelluläre Bestandteile beeinflusst. Die Zellen können damit in unterschiedliche Fraktionen sortiert und gezählt werden.

Hierzu dienen zwei Parameter: Das Vorwärtsstreulicht FSC (*Forward Scatter*) als Maß für die Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht SSC (*Side Scatter*) als Maß für die Granularität (Größe und Struktur des Zellkerns). Mit diesen beiden Parametern lassen sich zum Beispiel die Zellen des Blutes bereits recht gut auftrennen. Zudem kann man die Probe vorher mit Antikörpern, die mit verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen verbunden sind, inkubieren. Nach Markierung kann dann auch die Sortierung nach diesen Merkmalen erfolgen. Durch Einsatz verschiedenfarbiger Laser kann die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe und damit die Informationsdichte erhöht werden.

8 Tage alte ausplattierte EBs wurden durch Kollagenaseverdau (1 - 2 mg Kollagenase B pro ml IK-Puffer für 30 min bei 37°C auf dem Schüttler) vereinzelt, mit 1 x PBS gewaschen, abzentrifugiert (230 x g) und für 20 min mit eiskaltem Methanol fixiert. Jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen wurden für 60 min mit 10% FBS in 0,01% PBST geblockt und für weitere 60 min mit  $\alpha$ -Aktinin (1:200 in 10% FBS/0,01% PBST) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 0,1% PBST wurden die Zellen mit einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper (1:400) für 60 min im Dunkeln inkubiert. Zum Schluss wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einem FACS-Gerät analysiert.

## 4.9 Statistik

Alle Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt,  $n$  steht für die Anzahl der voneinander unabhängig durchgeführten Versuche.

Die Resultate wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Die Mittelwerte wurden als gewogenes arithmetisches Mittel angegeben, die Gesamtstandardabweichung wurde aus den gewichteten mittleren quadratischen Abweichungen der Einzelversuche berechnet.

Die Signifikanz wurde mit ANOVA (Analyse der Varianz), Student's t-Test und Dunnett's Test analysiert. \*  $P < 0,05$  wurde als signifikant angesehen, \*\*  $P < 0,01$  als sehr signifikant und \*\*\*  $P < 0,001$  als hochsignifikant.

## 5 Ergebnisse

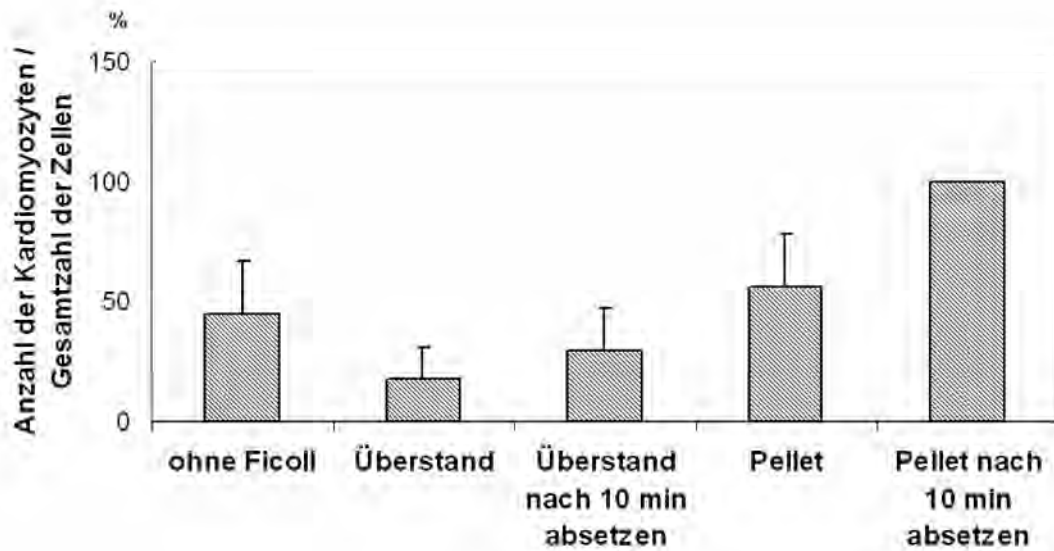
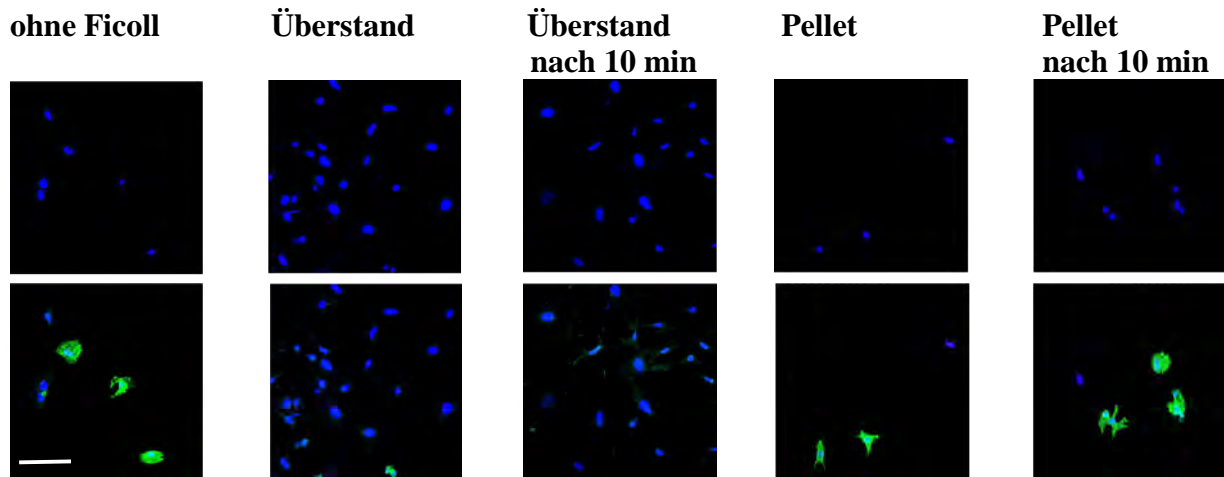
### *5.1 Isolation neonataler Kardiomyozyten*

In dieser Arbeit wurden aus embryonalen Stammzellen der Maus gewonnene Kardiomyozyten mit neonatalen Kardiomyozyten verglichen. Die Kardiomyozyten aus den Stammzellen wurden von 7 bis 9 Tage alten EBs, die neonatalen Kardiomyozyten aus 3 Tage alten Mäusen isoliert.

Um die Proliferation der Kardiomyozyten zu untersuchen, muss eine möglichst reine Zelllinie vorliegen, da die meisten anderen Zelltypen schneller proliferieren als Herzmuskelzellen und die Gefahr besteht, dass diese überwachsen werden. Daher wurde zu Beginn der Versuche die Methode zur Isolation neonataler Kardiomyozyten optimiert.

In *Abb. 5.1* ist zu sehen, dass nach einer Zelldissoziation mit Kollagenase B durch eine anschließende Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll® die Anzahl der Kardiomyozyten erhöht werden kann. Die Herzmuskelzellen sammeln sich im Pellet an, während im Überstand kaum  $\alpha$ -Aktinin-positive Zellen zu finden sind. Da Kardiomyozyten erst nach etwa 15 min am Boden der Zellkulturschale oder auf den Deckgläschen adhärent werden, wurde durch 10-minütiges Anwachsen der übrigen Zellen die Anzahl der Kardiomyozyten weiter erhöht. Dadurch konnte eine Reinheit der Kardiomyozyten von etwa 80% einen Tag nach der Isolation erreicht werden.





**Abb. 5.1:** Untersuchung der Isolations-technik neonataler Kardiomyozyten nach Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll®. Repräsentative Fluoreszenzbilder der Kernfärbung mit Sytox Green (obere Reihe) und Gegenfärbung mit sarkomerischem  $\alpha$ -Aktinin, um die Kardiomyozyten zu identifizieren (untere Reihe). Der Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

## ***5.2 Proliferationsfähigkeit der Kardiomyozyten***

Die Proliferationsfähigkeit der Kardiomyozyten aus Stammzellen und neonatalen Herzen der Maus wurde anhand verschiedener Proliferationsmarker untersucht.

BrdU wurde verwendet um auszuschließen, dass es sich bei den Ergebnissen um Hypertrophie und nicht um Proliferation handelt, da andere Marker des Zellzyklus auch bei Hypertrophie stimuliert werden können. 5 bis 8 Tage nach der Isolation nahm die Anzahl BrdU-positiver Zellkerne sowohl bei aus ES Zellen gewonnenen Kardiomyozyten als auch bei neonatalen Kardiomyozyten stark ab, was zeigt, dass es innerhalb weniger Tage zu einem starken Abfall der DNA-Synthese kam (*Abb. 5.2.1*).

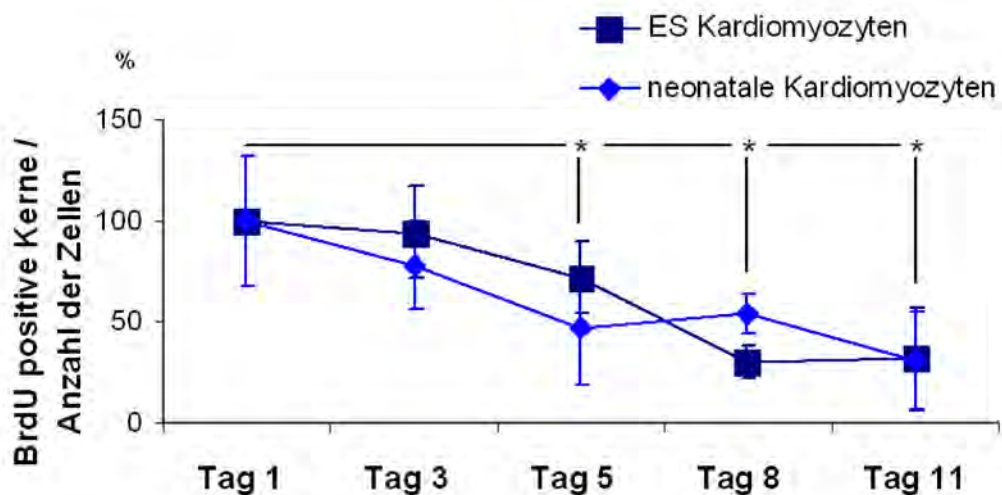
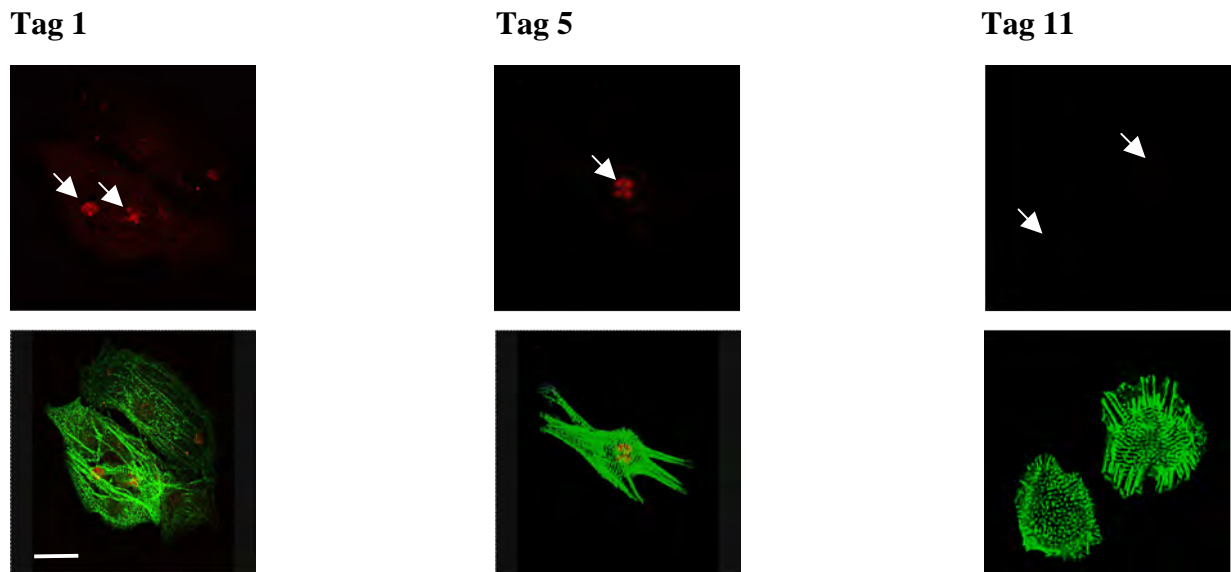
Dementsprechend nahm auch die Färbung des Proliferationsmarkers Ki-67 innerhalb weniger Tage nach Isolation der Kardiomyozyten ab (*Abb. 5.2.2*).

Zyclin D1 zeigte sich kurz nach der Isolation bei beiden untersuchten Kardiomyozytenpräparationen hauptsächlich im Kern, was typisch für proliferierende Zellen in der G1/S-Phase ist. Ab Tag 8 fand keine Kerntranslokation mehr statt, die Zyclin D1/CDK-Komplexe befanden sich im Zytoplasma (*Abb. 5.2.3*).

Auch die Immunreaktivität des phosphorylierten Retinoblastoms nahm im Lauf der Zeit ab, das Rb blieb vermutlich an den Transkriptionsfaktor E2F gebunden und blockierte dadurch den Zellzyklus (*Abb. 5.2.4*).

Parallel zur Untersuchung der positiven Signale des Zellzyklus wurde der kernlokalisierte CDK-Inhibitor p27<sup>KIP1</sup> untersucht. Hier wurde festgestellt, dass die p27<sup>KIP1</sup>-Expression innerhalb weniger Tage nach der Isolation hochreguliert wurde (*Abb. 5.2.5*).

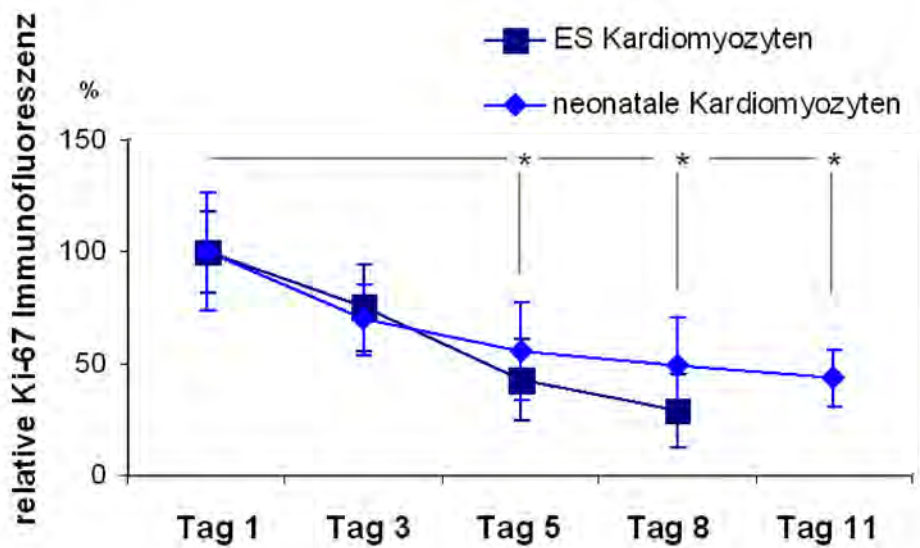
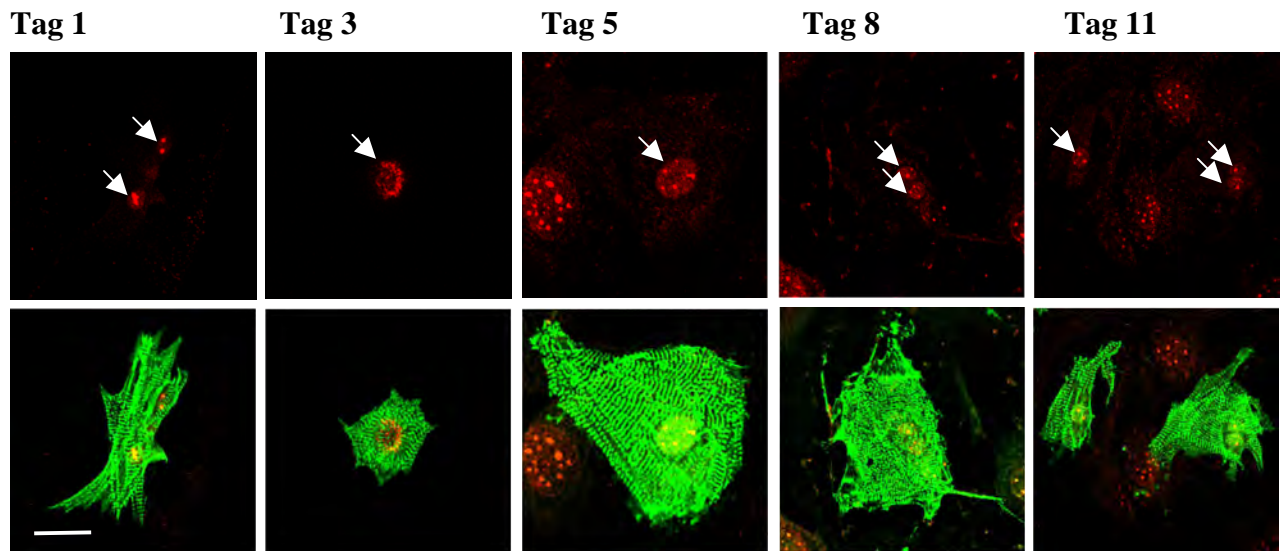
Insgesamt zeigen diese Daten, dass der Ablauf des Zellzyklusarrests der aus ES Zellen gewonnenen Kardiomyozyten mit dem neonataler Kardiomyozyten vergleichbar ist und die Proliferationsfähigkeit innerhalb von etwa einer Woche nach der Isolation der Zellen abnimmt.



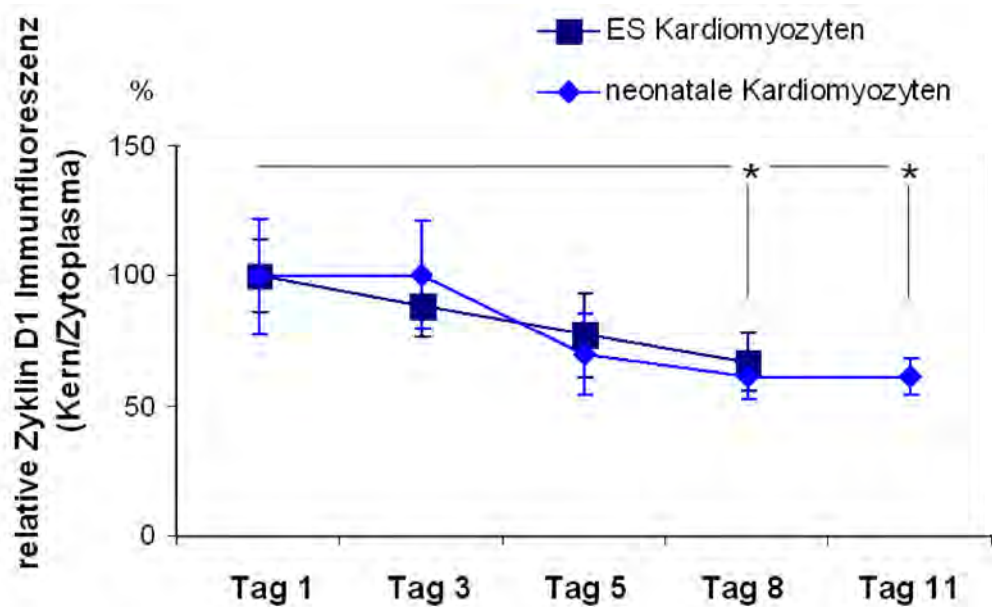
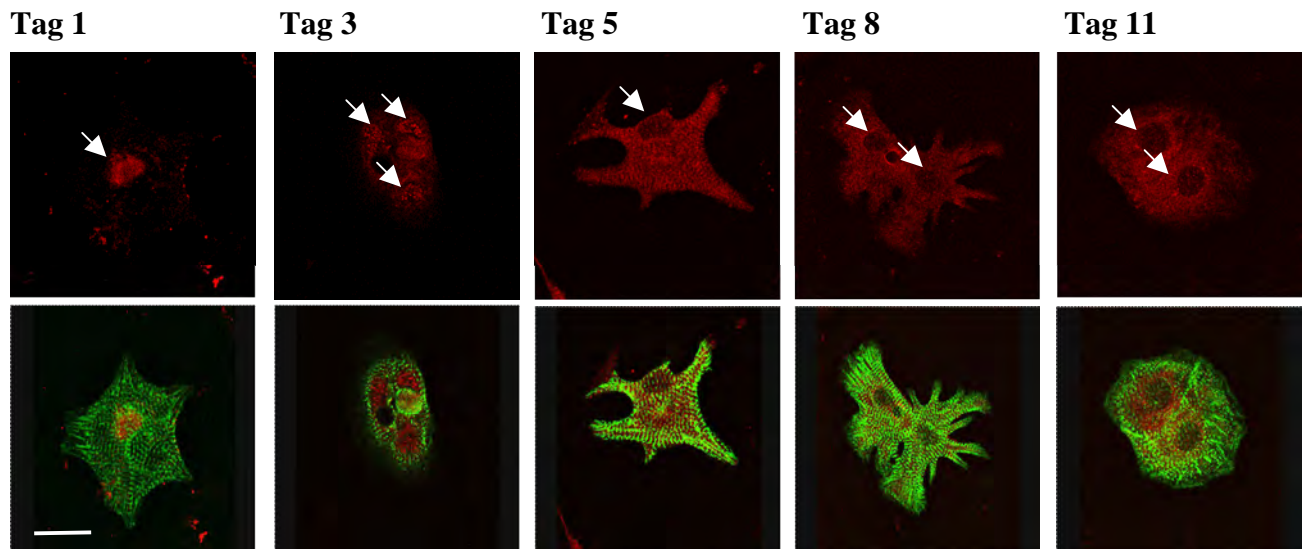
**Abb. 5.2:** Abnahme der Proliferationsfähigkeit von Kardiomyozyten nach Isolation aus Stammzellen und neonatalen Zellen der Maus. Repräsentative Fluoreszenzbilder der spezifischen Färbung (obere Reihe) und Gegenfärbung mit sarkomerischem  $\alpha$ -Aktinin als Nachweis der Kardiomyozyten zu identifizieren (untere Reihe). Der Balken entspricht 20  $\mu$ m. Die Pfeile zeigen auf die Zellkerne. \*  $P < 0,05$  wurde als signifikant im Vergleich zu Tag 1 gewertet.

**Abb. 5.2.1:** Abnahme der Anzahl BrdU-positiver Zellkerne der Herzmuskelzellen. Die isolierten Kardiomyozyten wurden 24 h vor der Fixierung mit 100  $\mu$ M BrdU inkubiert. An Tag 1 sind BrdU-positiv Zellen zu sehen, während an Tag 11 keine Färbung der Kerne vorhanden ist.

Der Graph zeigt die quantitative Auswertung der Anzahl BrdU-positiver Kerne bei Kardiomyozyten aus Stammzellen ( $n \geq 3$ ) und neonatalen Herzen ( $n \geq 4$ ).

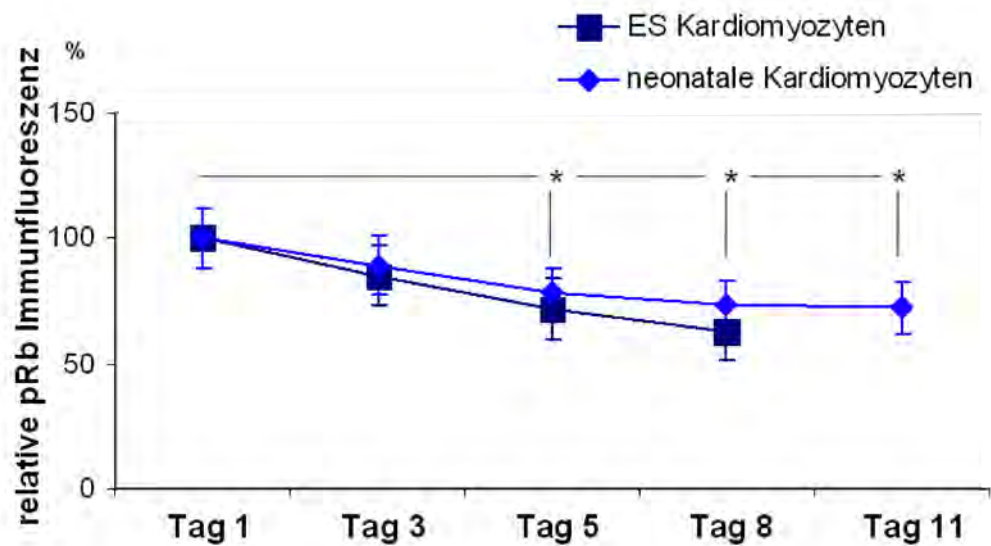
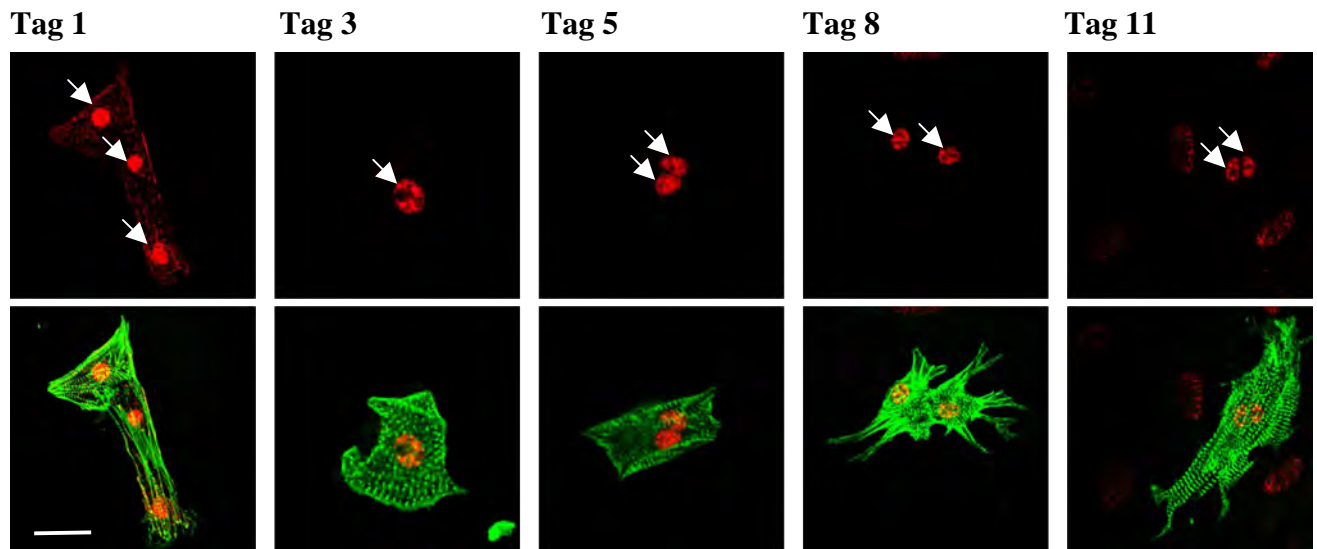


**Abb. 5.2.2:** Abnahme der Ki-67-Immunreaktivität der Zellkerne der Kardiomyozyten über die Zeit. Der Graph zeigt die quantitative Auswertung der relativen Immunfluoreszenz für Ki-67 bei Kardiomyozyten aus Stammzellen ( $n = 3$ ) und neonatalen Herzen ( $n = 3$ ).



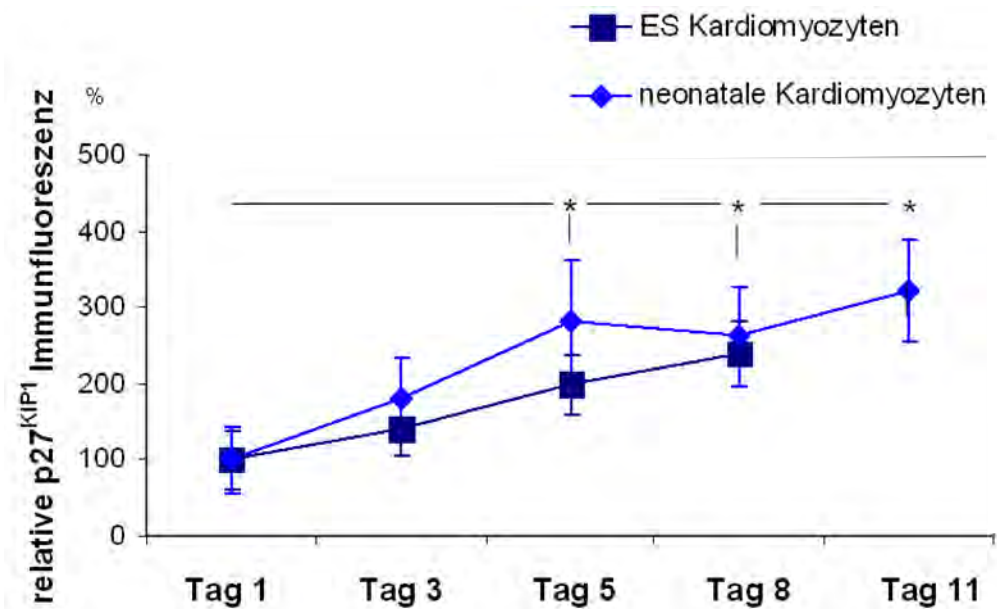
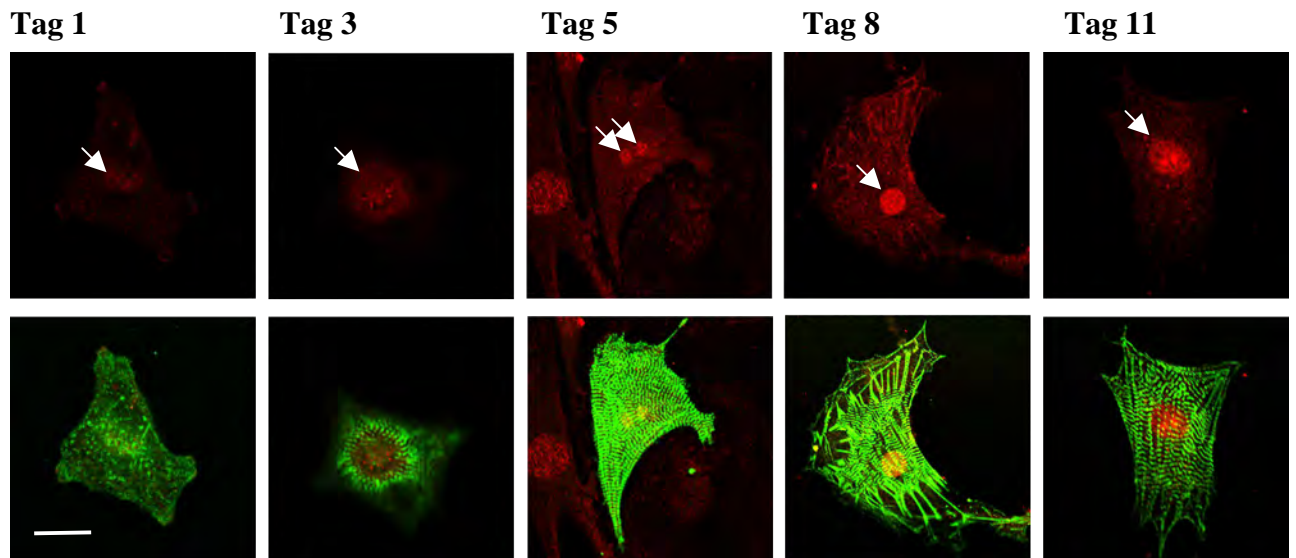
**Abb. 5.2.3:** Verteilung des Zyklin D1 in Kern und Zytoplasma.

Der Graph zeigt die quantitative Auswertung der relativen Zyklin D1-Immunfluoreszenz in Kern und Zytoplasma bei unterschiedlich alten Kardiomyozyten aus Stammzellen ( $n = 4$ ) und neonatalen Herzen ( $n = 4$ ).



**Abb. 5.2.4:** Reduktion der Phosphorylierung des Retinoblastoms in Herzmuskelzellen während verschiedener Dauer der Kultivierung.

Der Graph zeigt die quantitative Auswertung der relativen Immunfluoreszenz für pRb bei Kardiomyozyten aus Stammzellen ( $n = 3$ ) und neonatalen Herzen ( $n = 3$ ).



**Abb. 5.2.5:** Steigerung der  $p27^{KIP1}$ -Expression in Kardiomyozyten unterschiedlichen Alters.

Der Graph zeigt die quantitative Auswertung der relativen Immunfluoreszenz für  $p27^{KIP1}$  bei Kardiomyozyten aus Stammzellen ( $n = 3$ ) und neonatalen Herzen ( $n = 3$ ).

### 5.3 Konzentrationsbestimmung des $H_2O_2$

Da  $H_2O_2$  in hohen Konzentrationen toxisch wirkt, musste die optimale Konzentration zur Behandlung der Zellen festgestellt werden. Dazu wurden isolierte aus ES Zellen der Maus gewonnene Kardiomyozyten 4 Tage nach der Isolation für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen  $H_2O_2$  inkubiert, anschließend fixiert und mit phosphoryliertem Retinoblastom und  $\alpha$ -Aktinin immunzytochemisch gefärbt.

Parallel dazu wurden EBs in bakteriologischen Schalen ebenfalls an Tag 4 für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen  $H_2O_2$  inkubiert. An Tag 8 wurde die Anzahl der EBs mit kontrahierenden Arealen mikroskopisch ausgezählt.

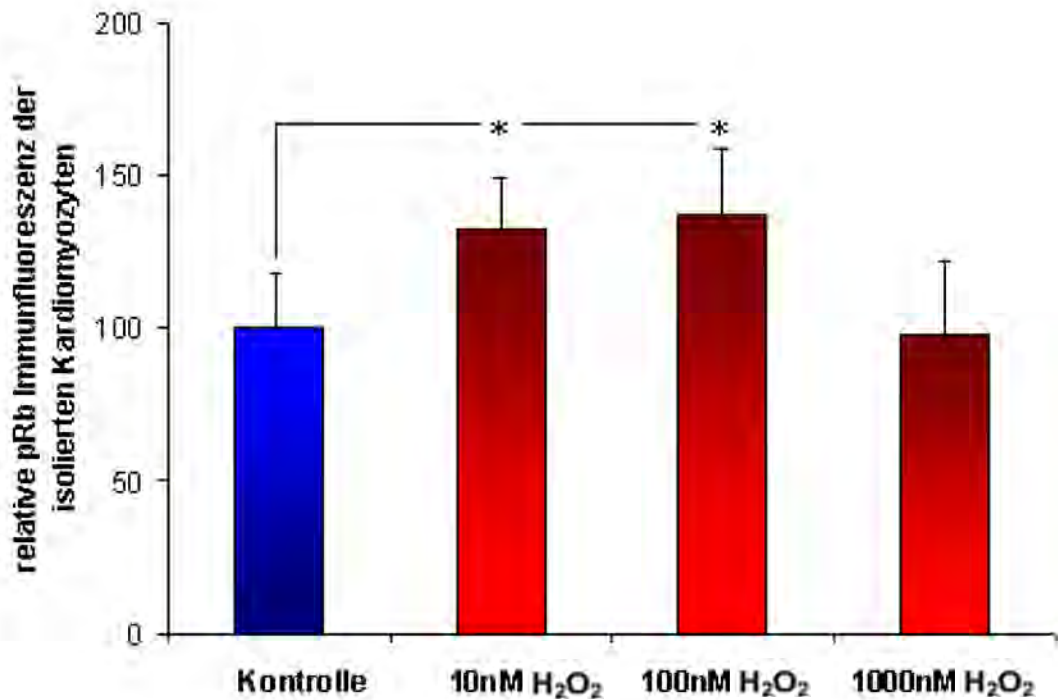
Es zeigte sich, dass bei den isolierten Kardiomyozyten eine Konzentration des  $H_2O_2$  von mehr als  $1 \mu M$  toxisch wirkte, während mit einer Konzentration von  $100 \text{ nM}$  die besten Ergebnisse erzielt wurden (A). Dies entspricht den in der Literatur angegebenen Werten (Sauer et al., 1999).

Auch bei den EBs war eine Konzentration  $> 1 \mu M$  toxisch, allerdings wirkte hier eine Konzentration von  $500 \text{ nM}$  am besten (B). Das lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass es sich bei EBs um einen dreidimensionalen Zellverband handelt, während die isolierten Kardiomyozyten in einer einzelligen Schicht vorliegen und dadurch leichter alle Zellen mit  $H_2O_2$  in Kontakt kommen.

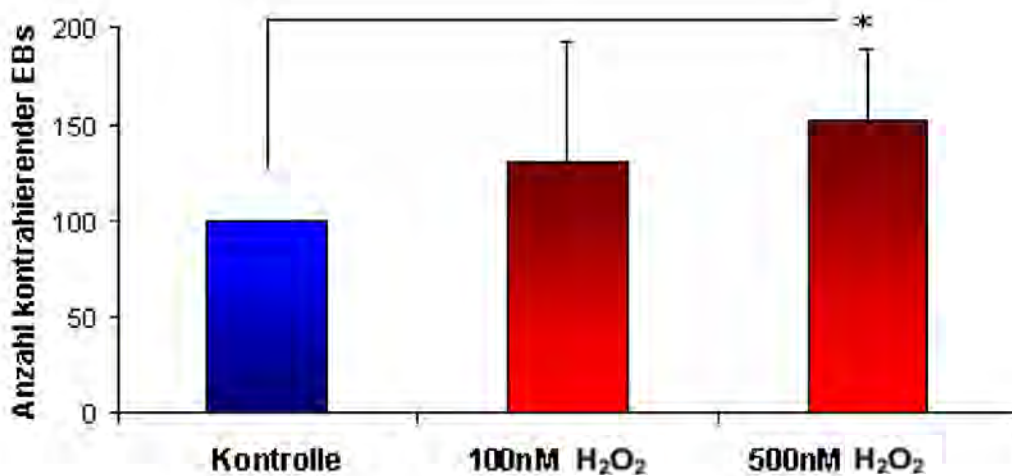
Bei den folgenden Versuchen wurden zur Behandlung mit  $H_2O_2$  die entsprechenden Konzentrationen verwendet.



A



B



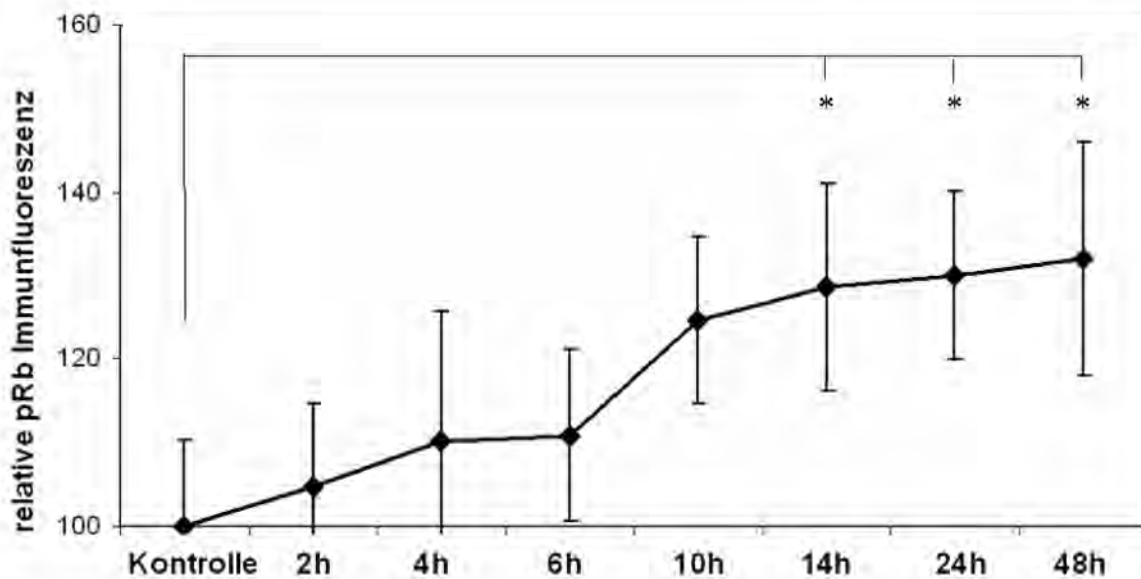
**Abb. 5.3:** Bestimmung der optimalen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration für die Behandlung der Kardiomyozyten  
 (A) Relative Fluoreszenz des phosphorylierten Retinoblastoms. Die isolierten Zellen wurden 4 Tage nach der Isolation für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt und anschließend mit pRb immunzytochemisch gefärbt ( $n = 4$ ).  
 (B) Bei den ausplattierten Embryonalkörperchen wurden die Zellen an Tag 4 für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt. An Tag 8 wurde die Anzahl der EBs mit kontrahierenden Arealen ausgezählt ( $n = 4$ ).

### 5.4 Inkubationszeit mit $H_2O_2$

Um die optimale Inkubationszeit mit  $H_2O_2$  festzustellen, wurde eine Dosiswirkungskurve erstellt. Isolierte Kardiomyozyten aus ES Zellen wurden etwa 4 Tage nach der Isolation über unterschiedlich lange Zeiträume einmalig mit 100 nM  $H_2O_2$  behandelt, anschließend gemeinsam fixiert und mit phosphoryliertem Retinoblastom und  $\alpha$ -Aktinin immunzytochemisch gefärbt.

Es zeigte sich, dass die Phosphorylierung des Rb bis zu einer Inkubationszeit von etwa 6 h langsam anstieg, dann bis etwa 10 h exponentiell zunahm und sich anschließend asymptotisch einem Maximalwert näherte. Ab einer Inkubationszeit von etwa 14 h stieg die Phosphorylierung des Rb kaum noch an.

Bei den folgenden Versuchen wurden die Zellen für 24 h mit 100 nM  $H_2O_2$  behandelt, da ab diesem Zeitpunkt die Änderungen in der Zellproliferation nicht mehr signifikant waren.



**Abb. 5.4:** Bestimmung der optimalen Inkubationszeit der Herzmuskelzellen mit 100 nM  $H_2O_2$ . Die isolierten Zellen wurden 4 Tage nach der Isolation für 24 h zu verschiedenen Zeiten mit  $H_2O_2$  behandelt und anschließend gleichzeitig fixiert und mit phosphoryliertem Retinoblastom immunzytochemisch gefärbt ( $n = 3$ ).

## ***5.5 Stimulation der Proliferation von Kardiomyozyten durch ROS***

Die Proliferationsinduktion der aus ES Zellen und neonatalen Herzen isolierten Kardiomyozyten durch exogen zugeführte ROS wurde immunhistochemisch mit BrdU, Ki-67, Zyklin D1, pRb und dem CDK-Inhibitor p27<sup>KIP1</sup> untersucht. Die Zellen wurden 4 Tage nach der Isolation für 24 h mit 100 nM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert, anschließend fixiert und gefärbt.

Durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde die Anzahl der BrdU-positiven Zellen erhöht, während die freien Radikalfänger Trolox bzw. NMPG einen Einbau des BrdU in die DNA verhinderten (*Abb. 5.5.1*).

Die Expression des Ki-67 wurde durch die Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sowohl in Kardiomyozyten aus ES Zellen als auch in neonatalen Kardiomyozyten signifikant erhöht (*Abb. 5.5.2*).

In der unbehandelten Kontrolle wurde nur wenig Zyklin D1 in den Kern transportiert. Nach Stimulation der Kardiomyozyten mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeigte sich eine signifikante Zunahme der intranukleären Proteinexpression. Die Kerntranslokation wurde durch die freien Radikalfänger inhibiert (*Abb. 5.5.3*).

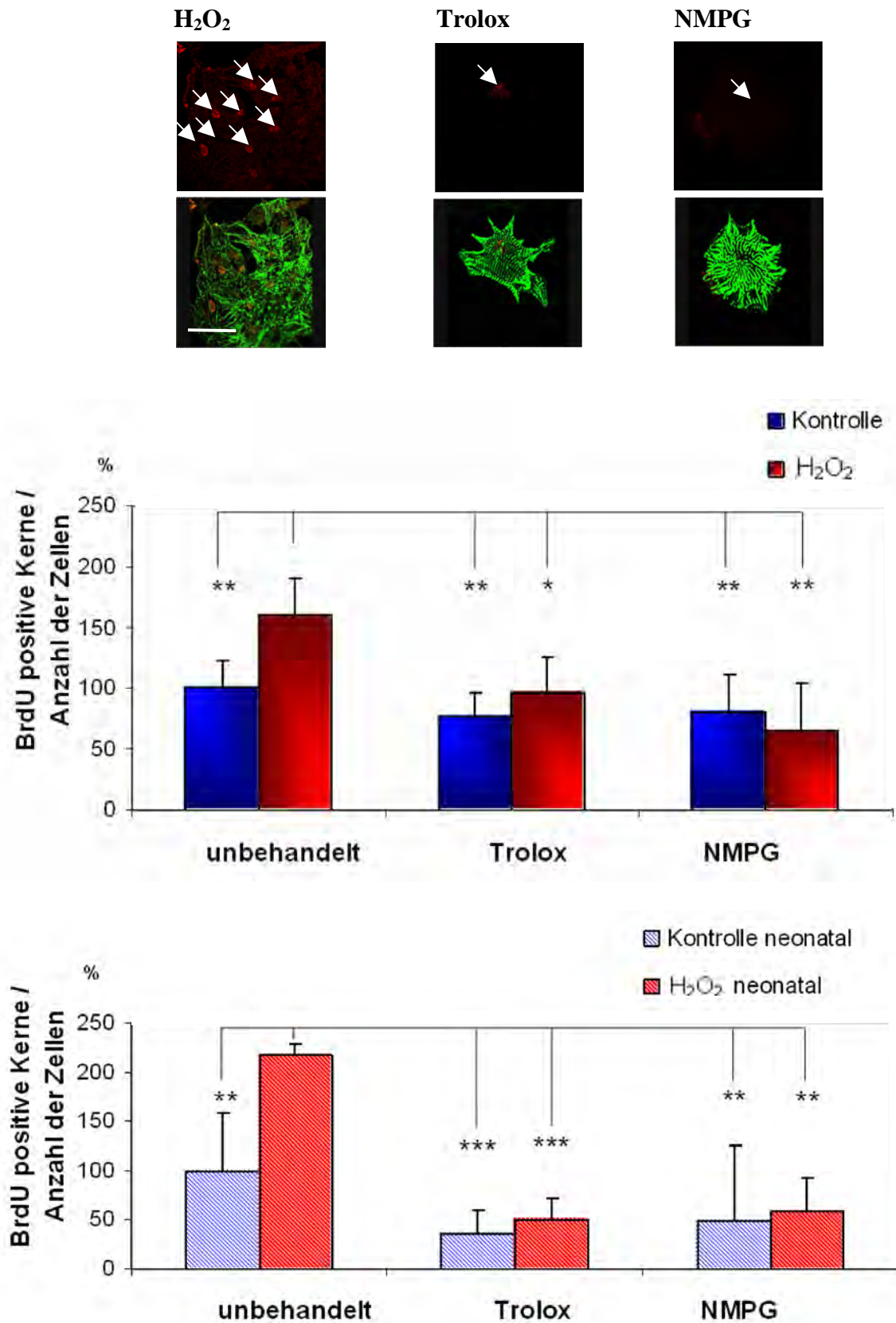
Bei den mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulierten Zellen wurde das Rb phosphoryliert, bei den unbehandelten und den mit Trolox und NMPG behandelten Kardiomyozyten konnte kaum Phosphorylierung nachgewiesen werden (*Abb. 5.5.4*), sowohl bei den aus ES Zellen isolierten Kardiomyozyten als auch bei neonatalen Herzmuskelzellen.

Im Vergleich zu den anderen Proben wurde bei den mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten Zellen die nukleäre p27<sup>KIP1</sup>-Expression signifikant erniedrigt (*Abb. 5.5.5*).

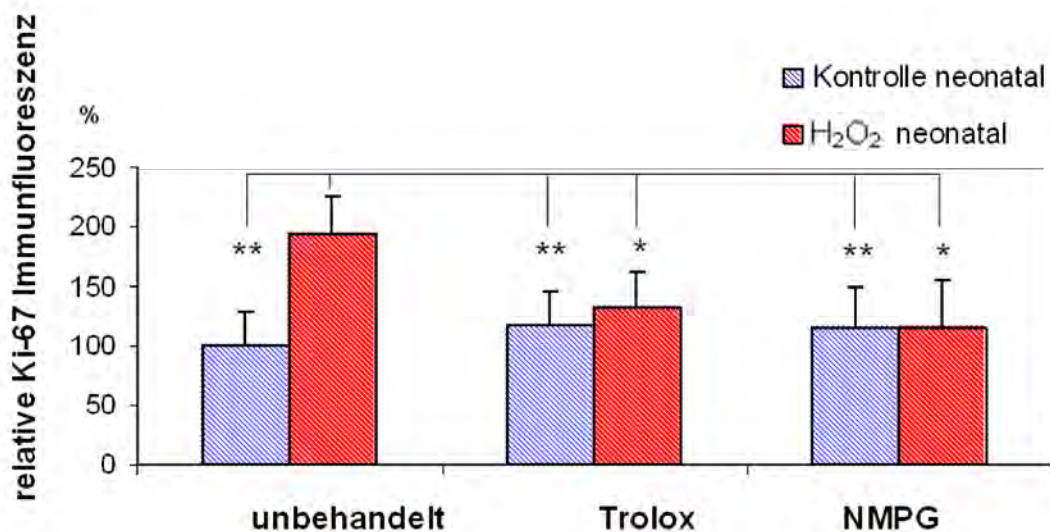
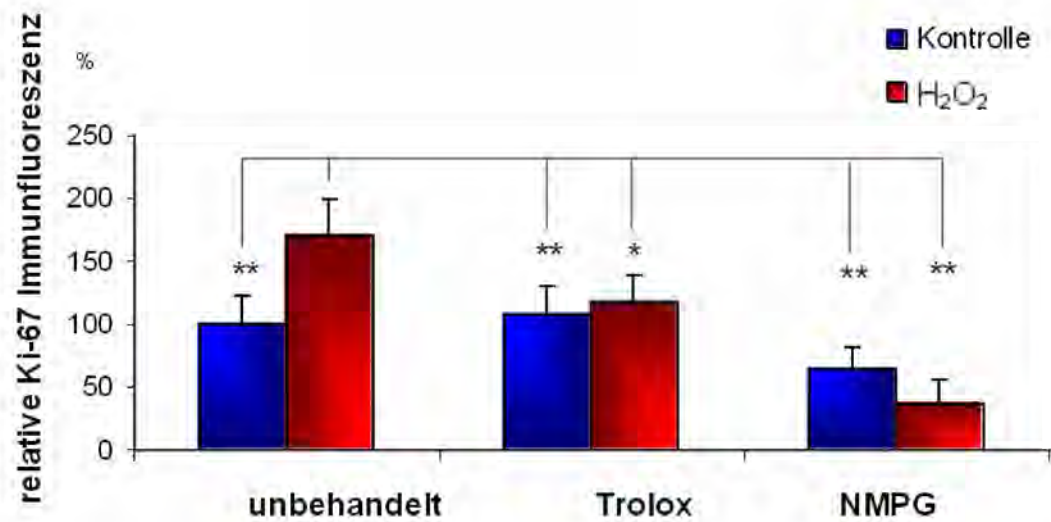
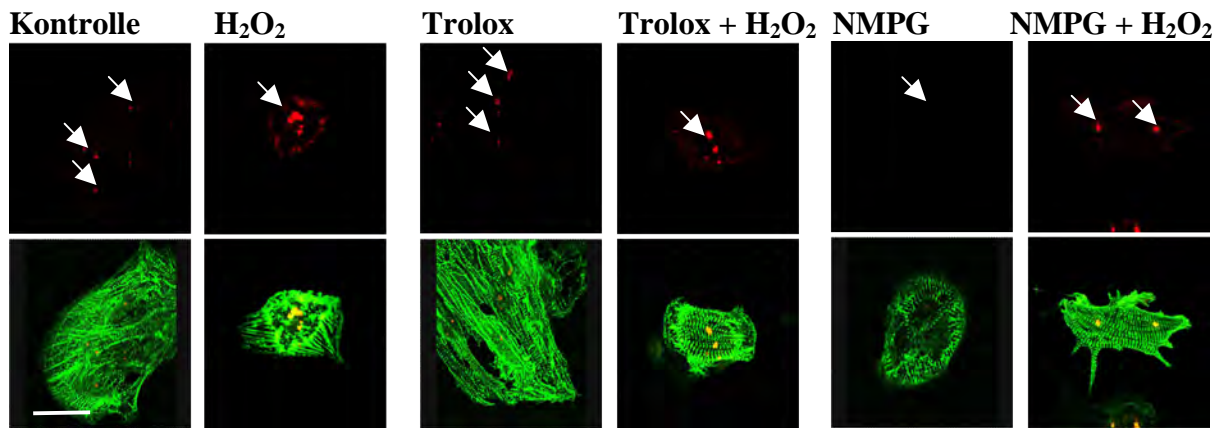
Insgesamt zeigen diese Daten deutlich, dass die Proliferation sowohl der neonatalen als auch der ES-Zell-abgeleiteten Kardiomyozyten durch niedrige Konzentrationen exogen zugeführter ROS stimuliert werden können.

**Abb. 5.5:** (zu den Bildern 5.5.1 bis 5.5.5) Untersuchung der Proliferationsfähigkeit von aus Stammzellen und neonatalen Zellen der Maus isolierten Kardiomyozyten nach Behandlung mit 100 nM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> an Tag 4. Der Effekt wurde durch Vorbehandlung mit den Radikalfängern Trolox (100 µM) und NMPG (100 µM) inhibiert.

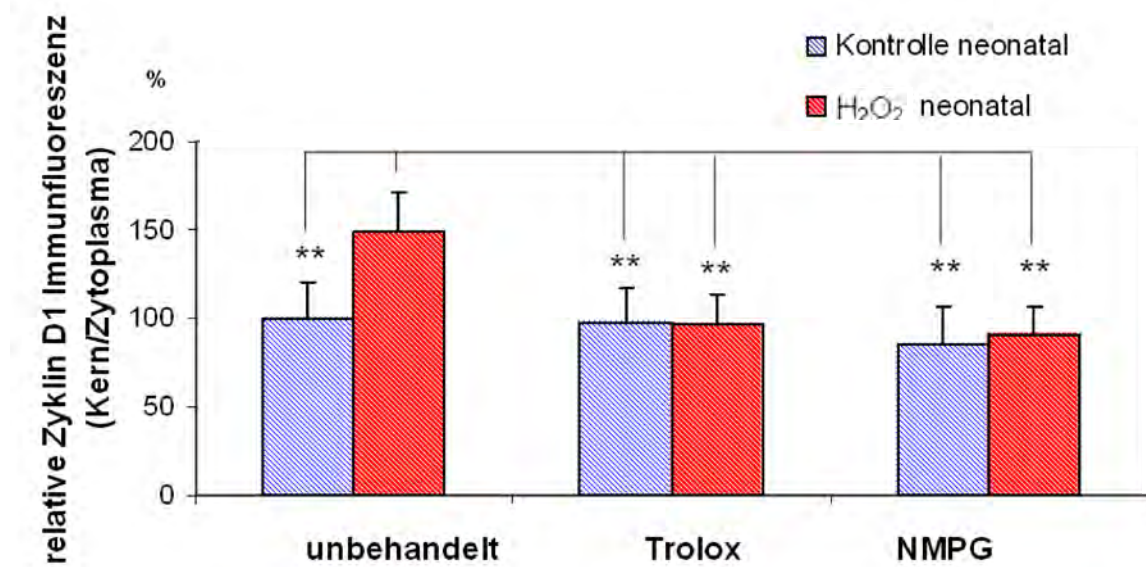
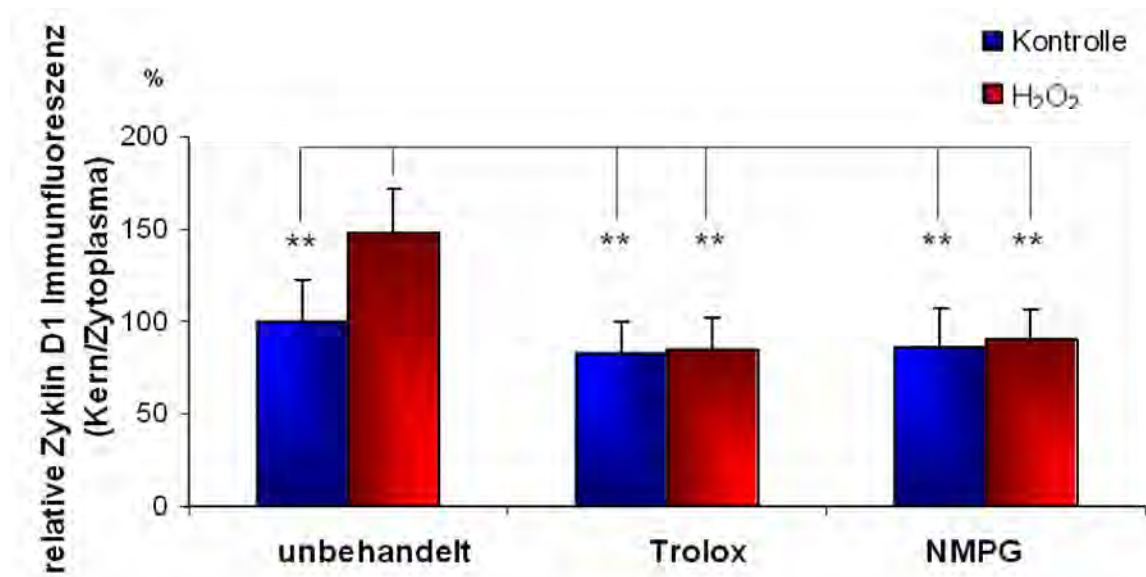
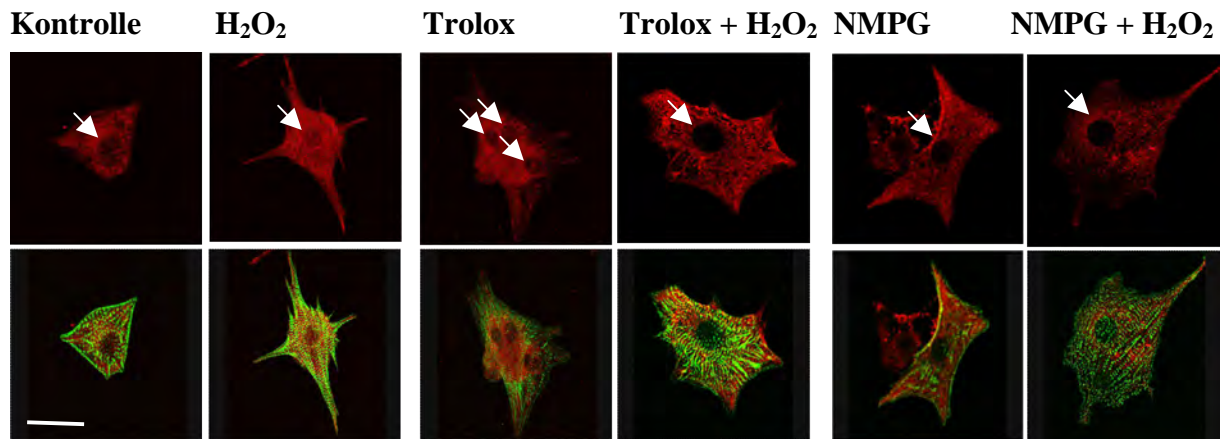
Repräsentative Fluoreszenzbilder der spezifischen Färbung (obere Reihe) und Gegenfärbung mit sarkomerischem α-Aktinin, um die Kardiomyozyten zu identifizieren (untere Reihe). Der Balken entspricht 20 µm.



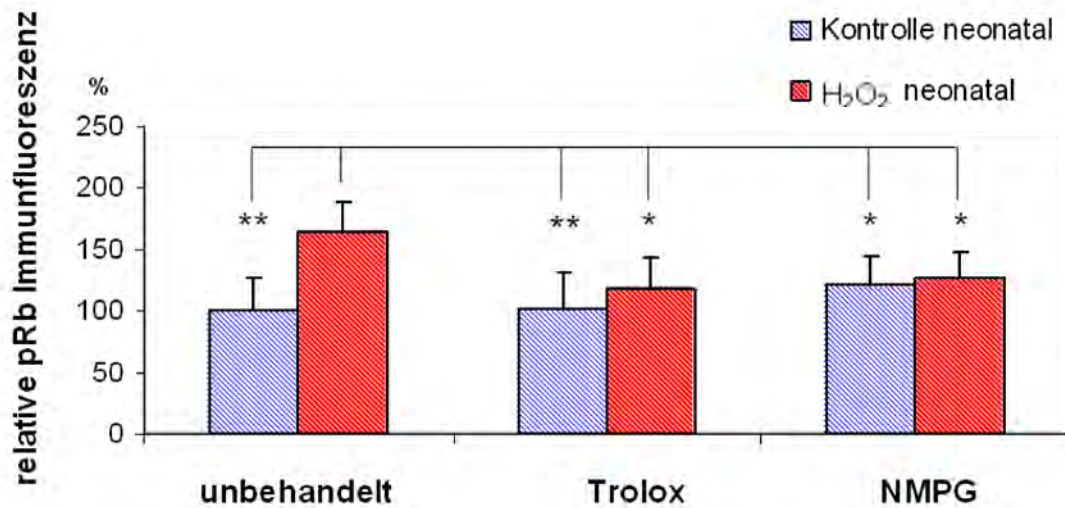
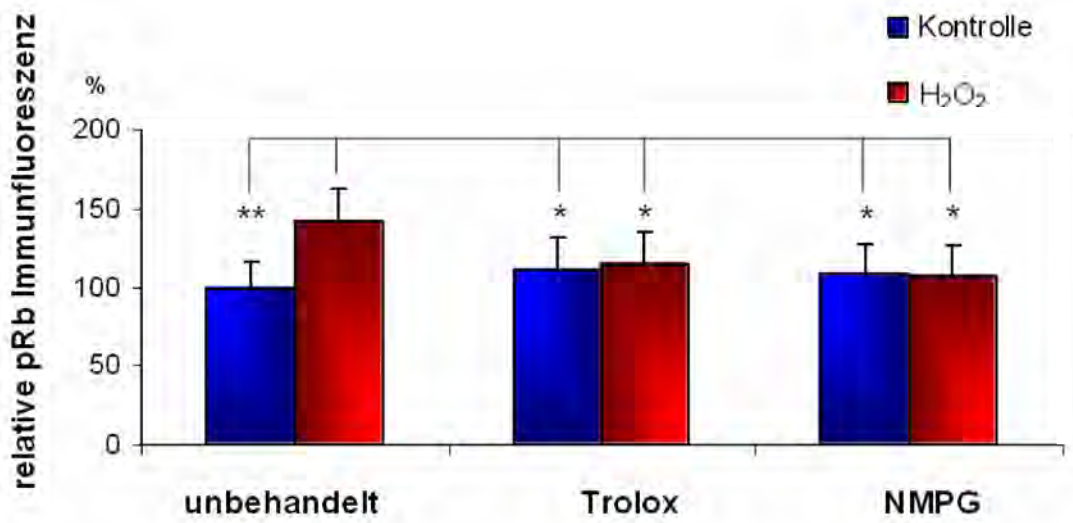
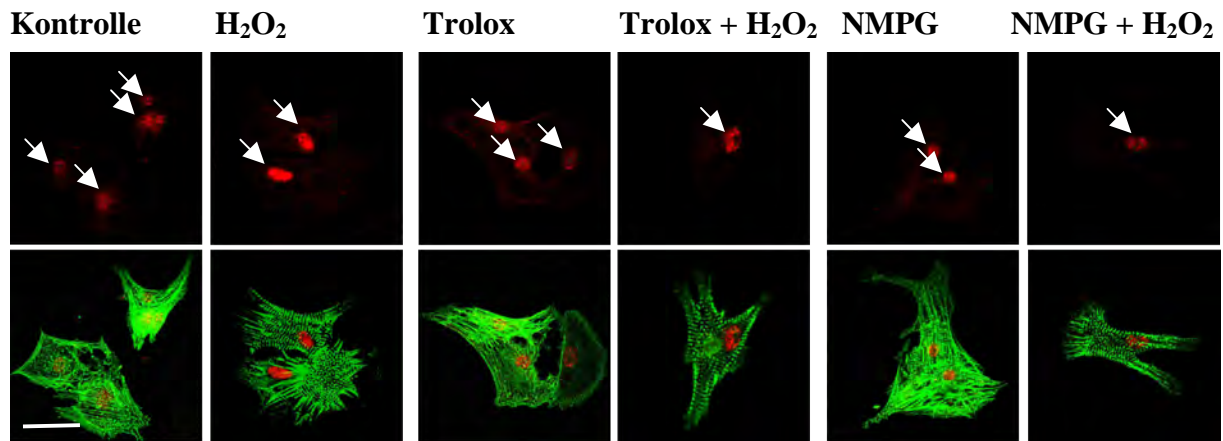
**Abb. 5.5.1:** Zunahme der Anzahl BrdU-positiver Zellkerne der Herzmuskelzellen nach Behandlung mit 100 nM  $H_2O_2$ . Die isolierten Kardiomyozyten aus Stammzellen ( $n = 4$ ) und neonatalen Herzen ( $n = 4$ ) wurden 24 h vor der Fixierung mit 100  $\mu$ M BrdU inkubiert.



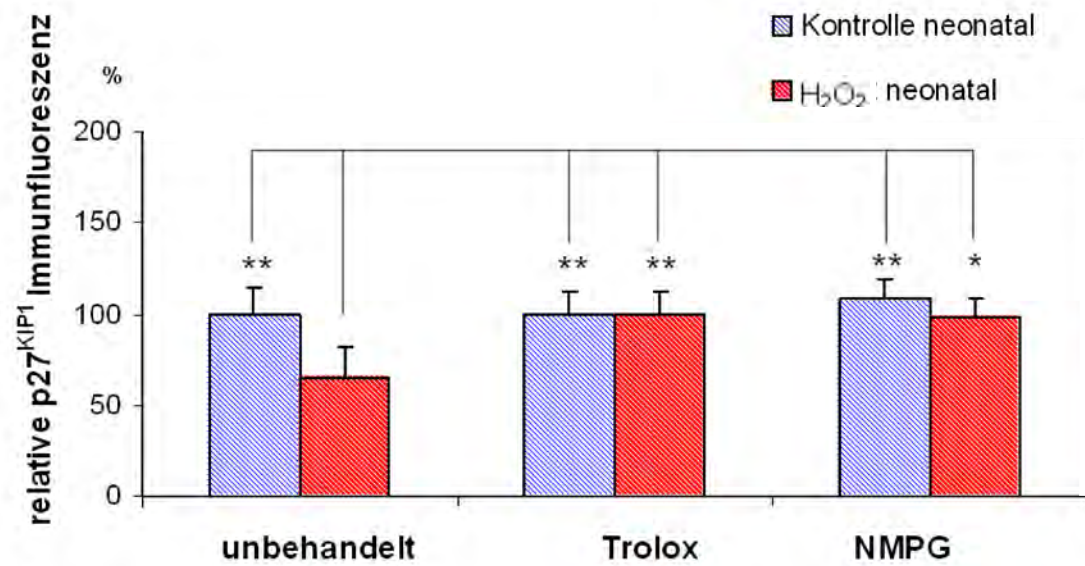
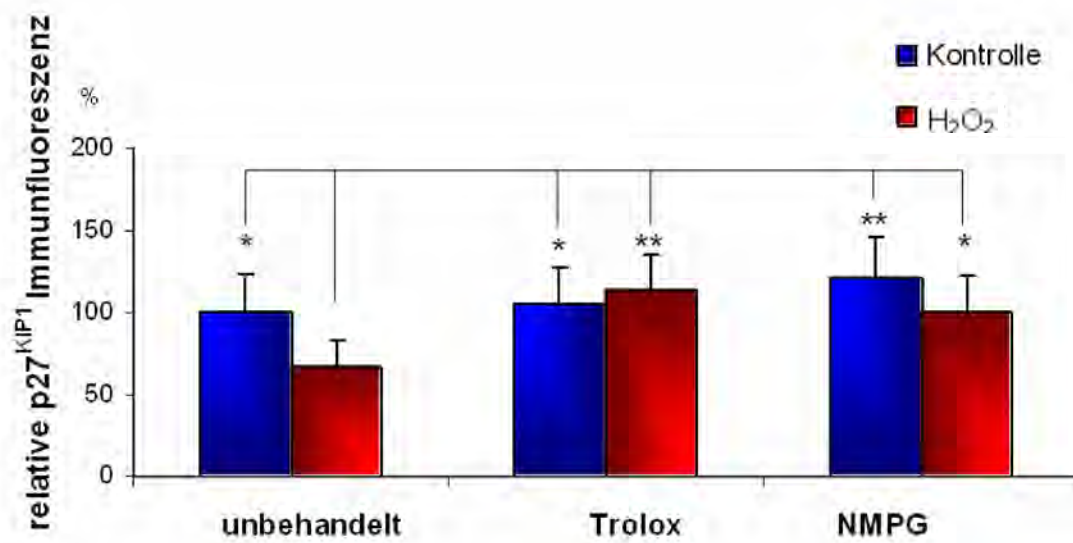
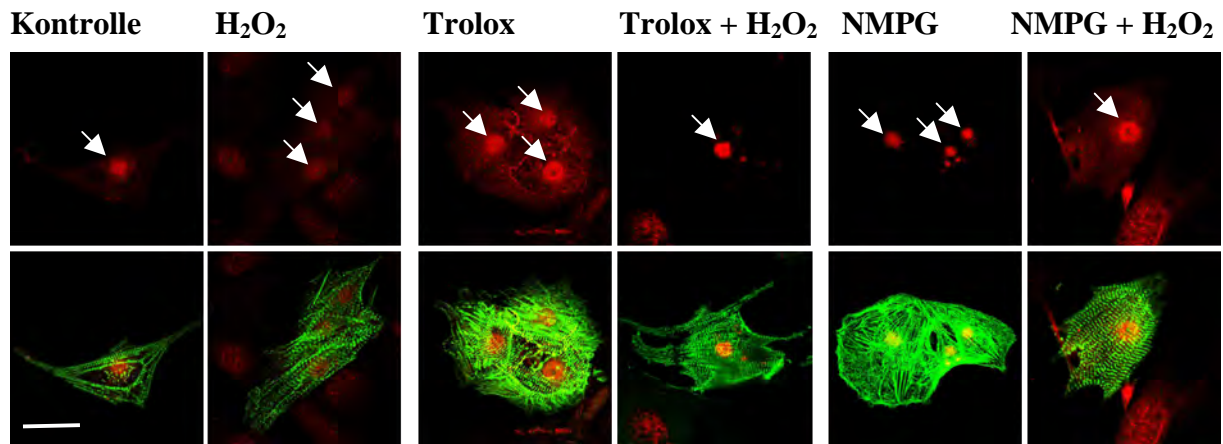
**Abb. 5.5.2:** Zunahme der Ki-67-Immunreaktivität der Zellkerne der Kardiomyozyten aus Stammzellen ( $n = 4$ ) und neonatalen Herzen ( $n \geq 4$ ) nach Behandlung mit 100 nM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Abb. 5.5.3:** Verteilung des Zyklin D1 in Kern und Zytoplasma nach Behandlung der Kardiomyozyten aus Stammzellen ( $n \geq 4$ ) und neonatalen Herzen ( $n \geq 4$ ) mit 100 nM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Abb. 5.5.4:** Phosphorylierung des Retinoblastoms nach Inkubation mit 100 nM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Herzmuskelzellen gewonnen aus Stammzellen ( $n \geq 6$ ) und neonatalen Herzen ( $n \geq 4$ ).



**Abb. 5.5.5:** Hemmung der intranukleären p27<sup>KIP1</sup>-Expression in Kardiomyozyten aus Stammzellen ( $n \geq 4$ ) und neonatalen Herzen ( $n \geq 4$ ).



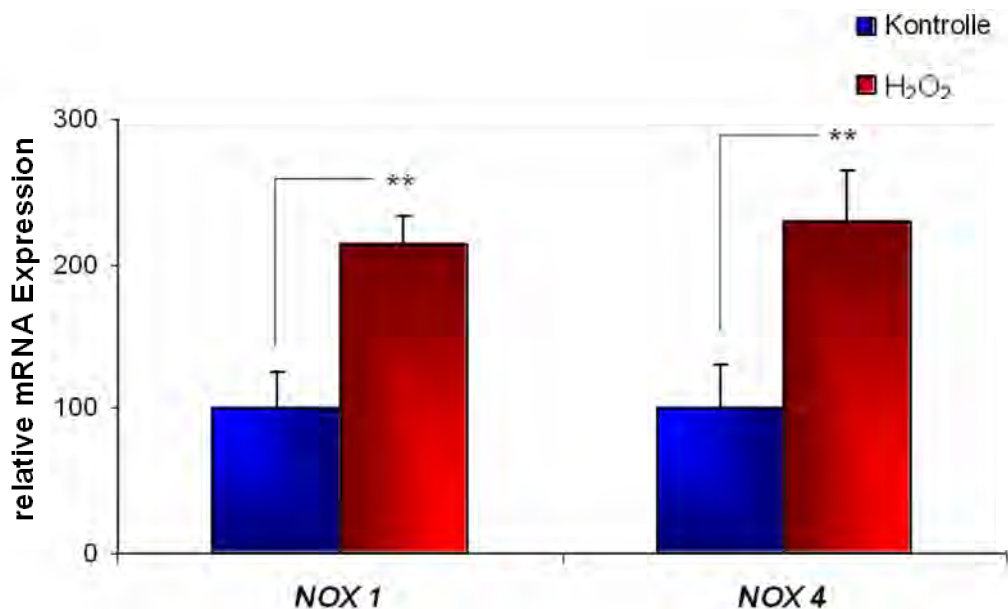
## 5.6 Einfluss der Behandlung mit $H_2O_2$ auf die Expression der NADPH-Oxidase

Nach einer Inkubation der EBs für 24 h mit 500 nM  $H_2O_2$  wurde der Effekt der ROS-Generierung auf die mRNA-Expression der NADPH-Oxidase untersucht (Abb. 5.6.1).

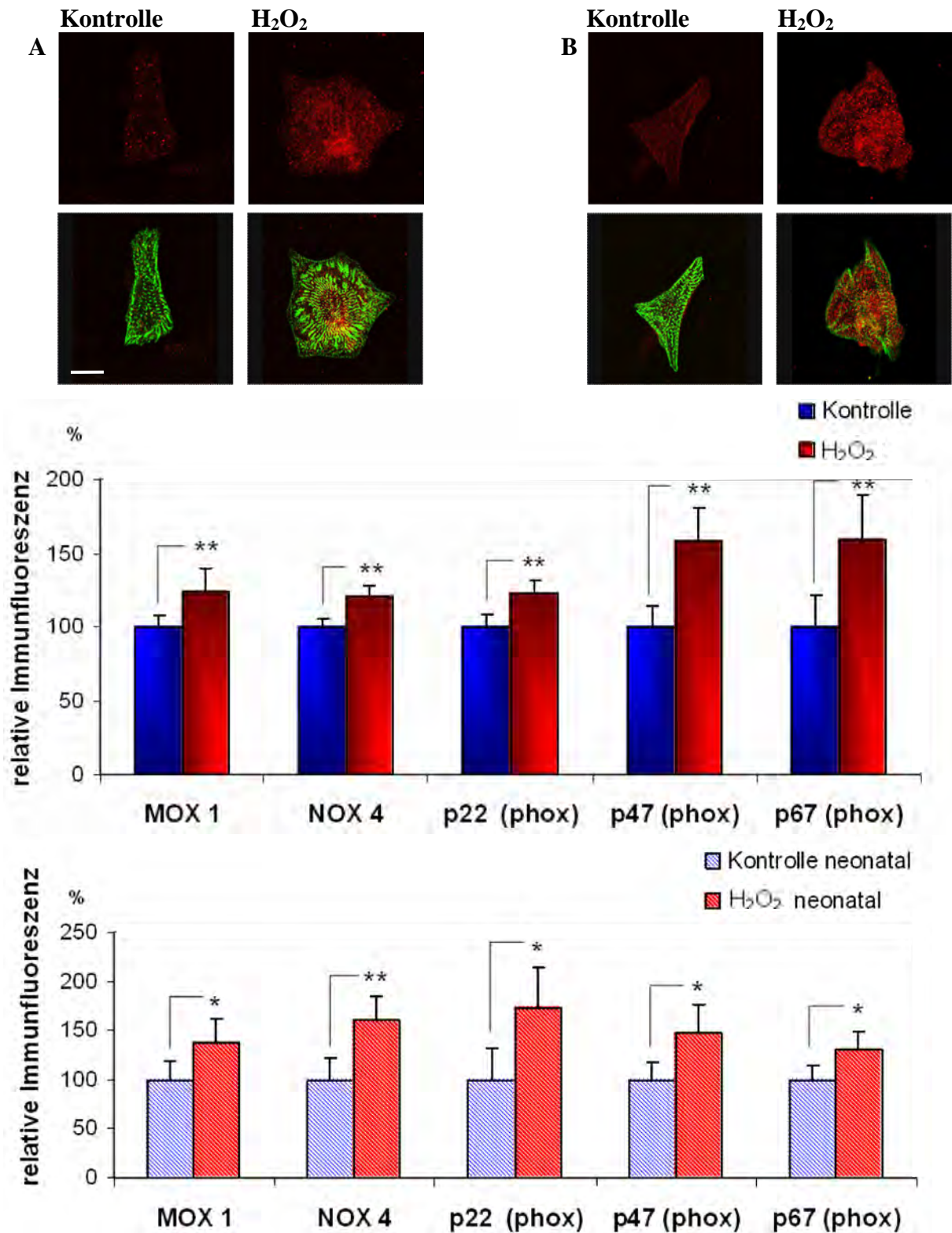
Die Behandlung führte sowohl bei *NOX 1* als auch bei *NOX 4* zu einer Steigerung der Genexpression.

Zum Nachweis, dass die NADPH-Oxidase bei Kardiomyozyten erhöht ist und nicht nur bei anderen Zelltypen in den EBs, wurden isolierte Kardiomyozyten mit 100 nM  $H_2O_2$  behandelt und auf verschiedene Untereinheiten der NADPH-Oxidase untersucht (Abb. 5.6.2).

Es wurde eine signifikante Steigerung der NADPH-Oxidase-Untereinheiten MOX 1 ( $n = 5$ ), NOX 4 ( $n = 4$ ), p22phox ( $n = 4$ ), p47phox ( $n = 4$ ) und p67phox ( $n = 4$ ) sowohl bei ES-Zell-abgeleiteten Kardiomyozyten als auch bei neonatalen Kardiomyozyten beobachtet.



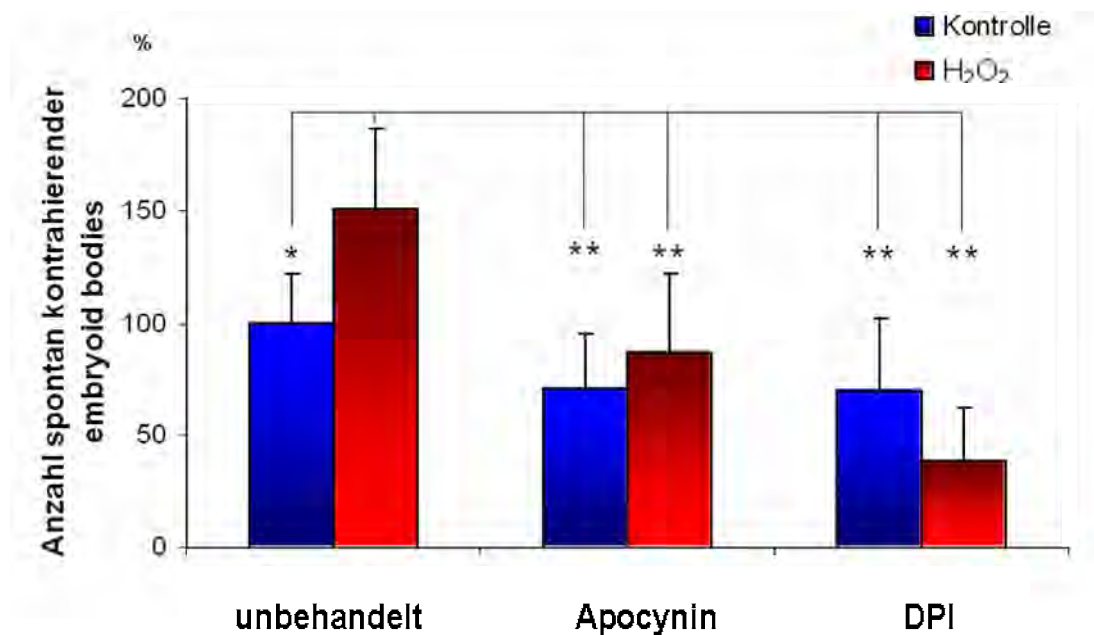
**Abb. 5.6.1:** Untersuchung der mRNA-Expression von *NOX 1* und *4* nach Behandlung der EBs mit 500 nM  $H_2O_2$ .



**Abb. 5.6.2:** Untersuchung der Effekte von 100 nM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Proteinexpression verschiedener NADPH-Oxidase-Untereinheiten bei Kardiomyozyten nach Isolation aus Stammzellen ( $n \geq 4$ ) und neonatalen Zellen der Maus ( $n \geq 4$ ). Repräsentative Fluoreszenzbilder der Färbung auf NOX 4 (A) und p67<sub>phox</sub> (B) (obere Reihe) und Gegenfärbung mit sarkomerischem  $\alpha$ -Aktinin (untere Reihe). Der Balken entspricht 20  $\mu$ m.

Um den Einfluss der NADPH-Oxidase auf die  $H_2O_2$ -abhängige Kardiomyogenese embryonaler Stammzellen weiter zu untersuchen, wurde die NADPH-Oxidase unterdrückt, indem EBs an Tag 4 der Differenzierung mit den NADPH-Oxidase-Inhibitoren Apocynin ( $10 \mu M$ ;  $n = 6$ ) und DPI ( $100 \text{ nM}$ ;  $n = 4$ ) vorbehandelt wurden. An Tag 8 wurde die Anzahl der EBs mit spontan kontrahierenden Arealen ausgezählt und mit der unbehandelten Kontrolle verglichen (Abb. 5.6.3).

Die Behandlung mit  $H_2O_2$  steigerte die Anzahl der EBs mit schlagenden Arealen um etwa 50%. Die Vorbehandlung mit NADPH-Oxidase-Inhibitoren verhinderte die Stimulation der Kardiomyogenese durch  $500 \text{ nM } H_2O_2$  vollständig und verminderte auch die Kardiomyogenese in den Kontrollen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, ohne allerdings statistische Signifikanz zu erreichen.

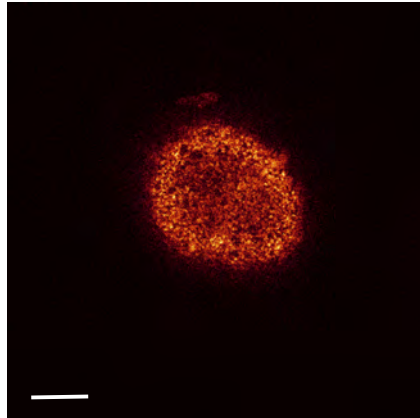


**Abb. 5.6.3:** Hemmung der Anzahl kontrahierender EBs durch Behandlung mit den NADPH-Oxidase-Inhibitoren Apocynin ( $10 \mu M$ ) und DPI ( $100 \text{ nM}$ ) ( $n \geq 4$ ). Die Anzahl der EBs mit schlagenden Arealen wurde mikroskopisch ausgezählt.

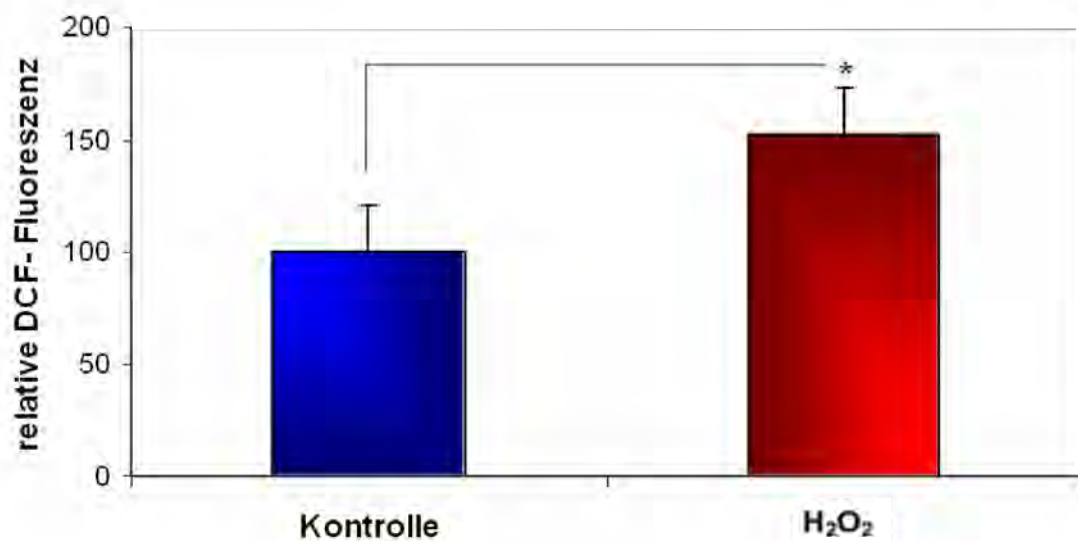
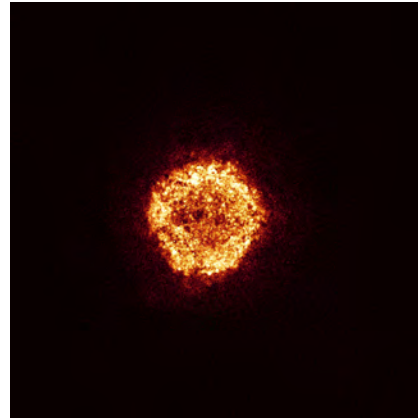
Prooxidantien können die intrazelluläre ROS-Generierung beeinflussen. Daher wurde die Bildung von ROS 24 h nach Behandlung ganzer EBs mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  untersucht (Abb. 5.6.4).

Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der DCF-Fluoreszenz.

Kontrolle



$\text{H}_2\text{O}_2$

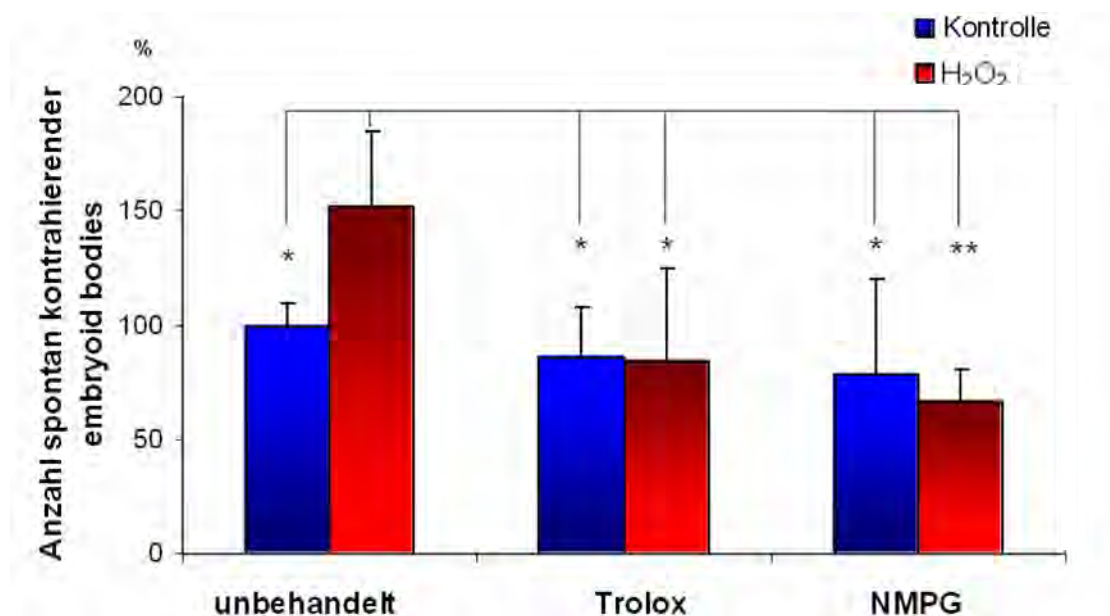


**Abb. 5.6.4:** Nachweis von ROS nach Behandlung der EBs mit 500 nM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Die Freisetzung intrazellulärer ROS wurde immunfluorometrisch gemessen ( $n = 3$ ). Bei den Bildern handelt es sich um repräsentative Fluoreszenzbilder der DCF-Fluoreszenz. Der Balken entspricht 100 µm.

### 5.7 Stimulation der Kardiomyogenese durch ROS

Aus Stammzellen gewonnene EBs wurden an Tag 4 der Differenzierung ausplattiert und für 24 h mit 500 nM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. An Tag 8 wurde die Anzahl der EBs mit spontan kontrahierenden Arealen mikroskopisch ausgezählt und mit der unbehandelten Kontrolle verglichen (Abb. 5.7). Um zu bestätigen, dass ROS an der Proliferation beteiligt sind, wurde der Einfluss der Radikalfänger Trolox (100 µM; n = 3) und NMPG (100 µM; n = 3) auf die durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierte Kardiomyogenese untersucht. Die Zellen wurden für 2 h mit den freien Radikalfängern vorinkubiert.

In der Kontrolle besaßen etwa 20 - 60% der EBs spontan kontrahierende Areale, die Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> steigerte die Anzahl der EBs mit schlagenden Arealen um etwa 50%. Das weist darauf hin, dass die Kardiomyozytenproliferation durch ROS stimuliert wird. Die Vorbehandlung mit Radikalfängern verhinderte die Stimulation der Kardiomyogenese durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vollständig und verminderte auch die Kardiomyogenese in der Kontrolle, ohne allerdings statistische Signifikanz zu erreichen.



**Abb. 5.7:** Steigerung der Kardiomyogenese durch Behandlung mit 500 nM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> an Tag 4 für 24 h. Die Anzahl kontrahierender EBs wurde durch Behandlung mit den Radikalfängern Trolox (100 µM) und NMPG (100 µM) (n ≥ 3) gehemmt. Die Anzahl der EBs mit schlagenden Arealen wurde mikroskopisch ausgezählt.

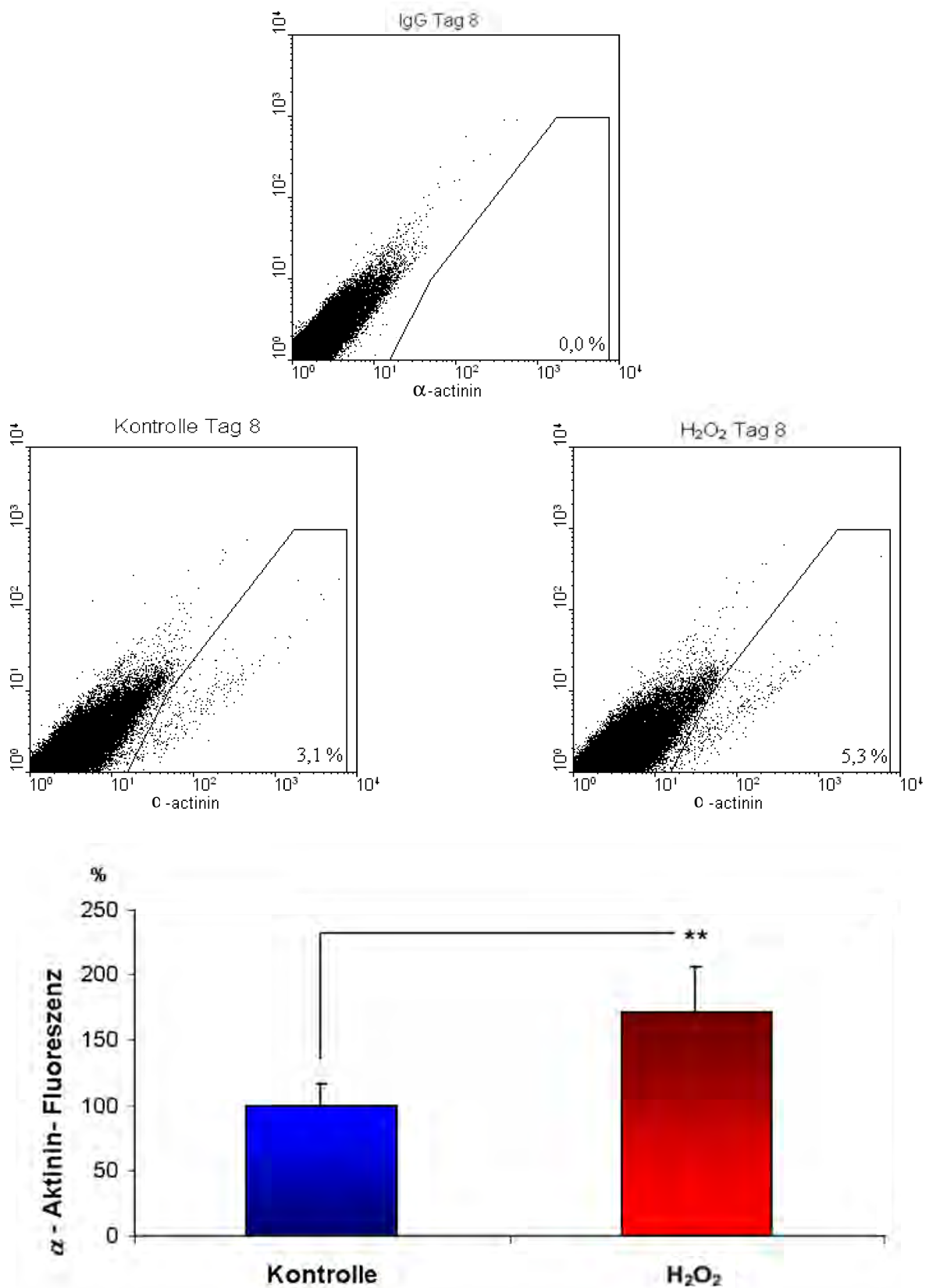
## ***5.8 Untersuchung der Kardiomyozytenproliferation durch FACS-Analyse und mikroskopische Bestimmung***

Um die Stimulation der Kardiomyogenese durch ROS zu verifizieren, wurde eine Durchflusszytometrie der an Tag 4 mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten EBs durchgeführt. Nach enzymatischer Dissoziation an Tag 8 wurden die Zellen mit  $\alpha$ -Aktinin gefärbt und durch eine FACS-Analyse untersucht (*Abb. 5.8.1*).

In der unbehandelten Kontrolle waren etwa 3,1% der Zellen Kardiomyozyten, nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde eine Steigerung auf etwa 5,3% beobachtet. Das ist eine Steigerung der Kardiomyozytenzahl um etwa 70% ( $n = 6$ ). Vergleichbare Zahlen des Anteils der Herzmuskelzellen in EBs wurden schon früher in der Literatur beschrieben (Buesen et al., 2004; Müller et al., 2000).

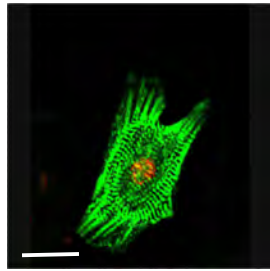
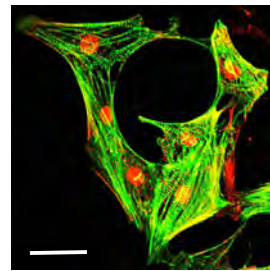
Um die Kardiomyozytenproliferation durch ROS bei isolierten Zellen weiter zu bestätigen, wurden isolierte aus ES Zellen gewonnene und neonatale Kardiomyozyten 4 Tage nach der Isolation mit 100 nM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen mit  $\alpha$ -Aktinin und dem Kernfarbstoff Sytox Green gefärbt, die Anzahl der Kardiomyozyten wurde durch mikroskopische Untersuchung bestimmt (*Abb. 5.8.2*).

Es wurde festgestellt, dass die Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Anzahl der Kardiomyozyten sowohl bei aus Stammzellen isolierten als auch bei neonatalen Herzmuskelzellen signifikant um 70% erhöhte. Das zeigt deutlich, dass niedrige Konzentrationen von ROS die Zellproliferation isolierter Kardiomyozyten stimuliert.

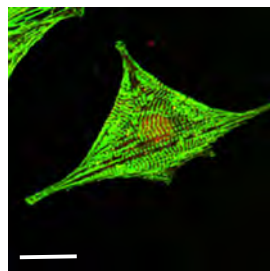
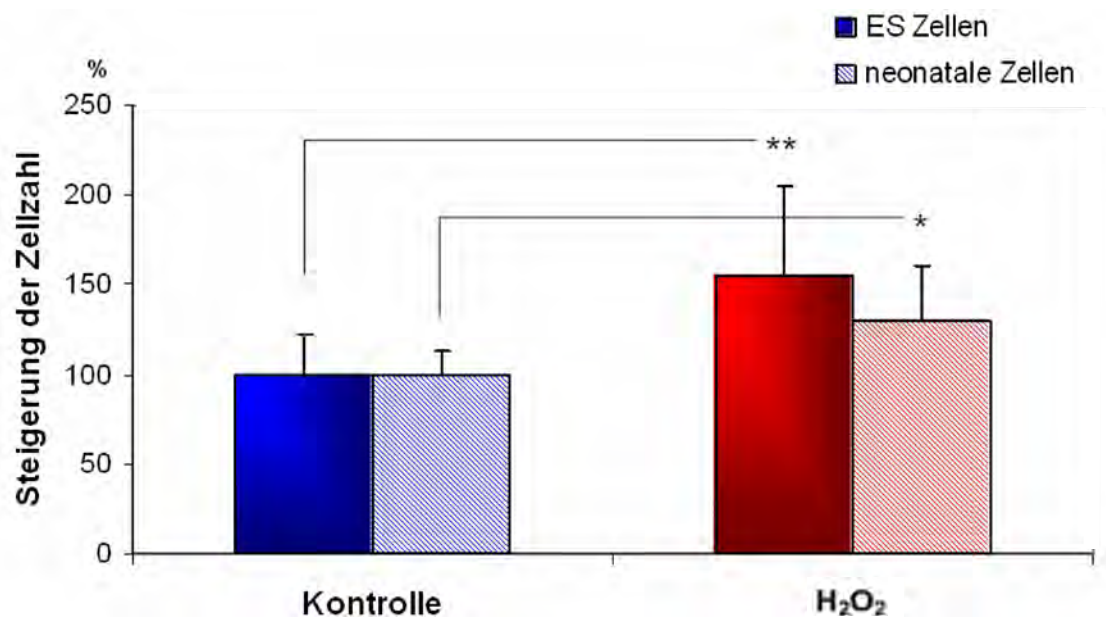
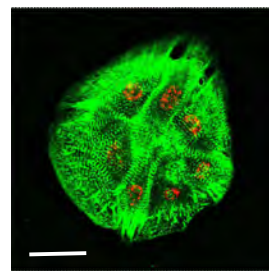


**Abb. 5.8.1:** FACS-Analyse der  $\alpha$ -Aktinin-positiven Zellen in EBs nach Behandlung mit 500 nM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 24 h. Repräsentative FACS-Bilder der IgG-Kontrolle, der unbehandelten Kontrolle und der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Zellen.

Kontrolle

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Kontrolle neonatal

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> neonatal

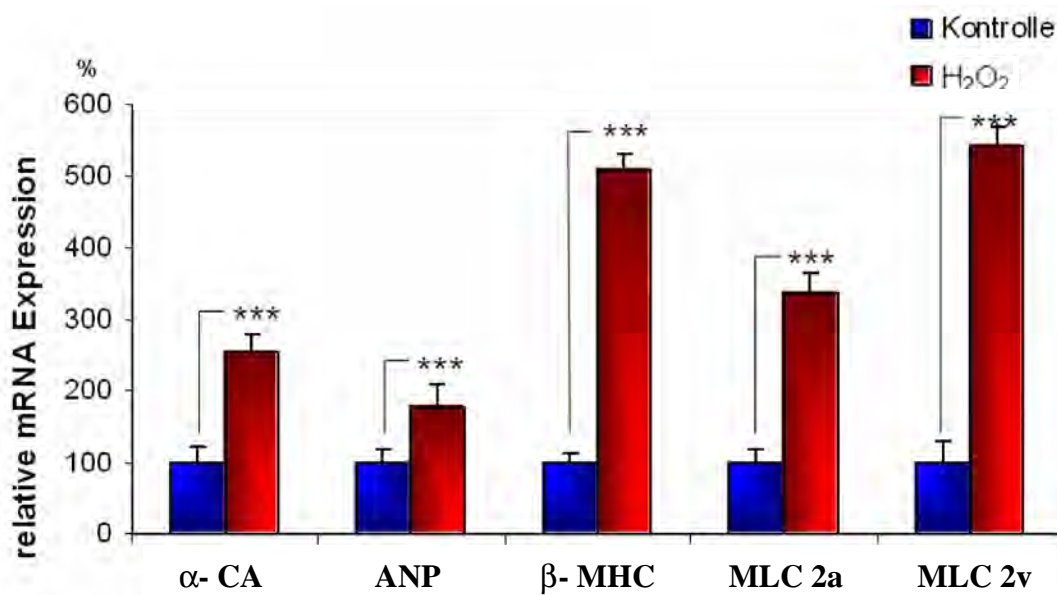
**Abb. 5.8.2:** Steigerung der Anzahl an Kardiomyozyten nach Behandlung mit 100 nM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 24 h. Die Zellzahl wurde durch immunhistochemische Färbung auf sarkomerisches  $\alpha$ -Aktinin und Kernfärbung mit Sytox Green durch mikroskopische Untersuchung bei Stammzellen ( $n = 11$ ) und neonatalen Zellen der Maus ( $n = 12$ ) bestimmt. Repräsentative Fluoreszenzbilder der Kardiomyozytenfärbung bei embryonalen Stammzellen (obere Reihe) und neonatalen Zellen der Maus (untere Reihe). Der Balken entspricht 20  $\mu$ m.



### 5.9 Untersuchung herzspezifischer Gene

Des Weiteren wurde die Expression verschiedener herzspezifischer Gene nach Behandlung der ausplattierten EBs mit  $H_2O_2$  untersucht. Die EBs wurden 4 Tage nach Beginn der Differenzierung für 24 h mit 500 nM  $H_2O_2$  inkubiert, die Isolation der mRNA erfolgte an Tag 8 (Abb. 5.9).

Bei allen untersuchten herzspezifischen Genen ( $\alpha$ -CA, ANP,  $\beta$ -MHC, MLC 2a und MLC 2v) wurde ein hochsignifikanter Anstieg der Genexpression beobachtet, was deutlich zeigt, dass die Kardiomyogenese der ES Zellen durch niedrige Konzentrationen exogen zugeführter ROS stimuliert werden kann.



**Abb. 5.9:** Stimulation der herzspezifischen Gene  $\alpha$ -CA, ANP,  $\beta$ -MHC, MLC 2a und MLC 2v durch Behandlung mit 500 nM  $H_2O_2$  an Tag 4 für 24 h ( $n = 4$ ).

### ***5.10 Redoxregulation herzspezifischer Transkriptionsfaktoren und des Wachstumsfaktors BMP-10***

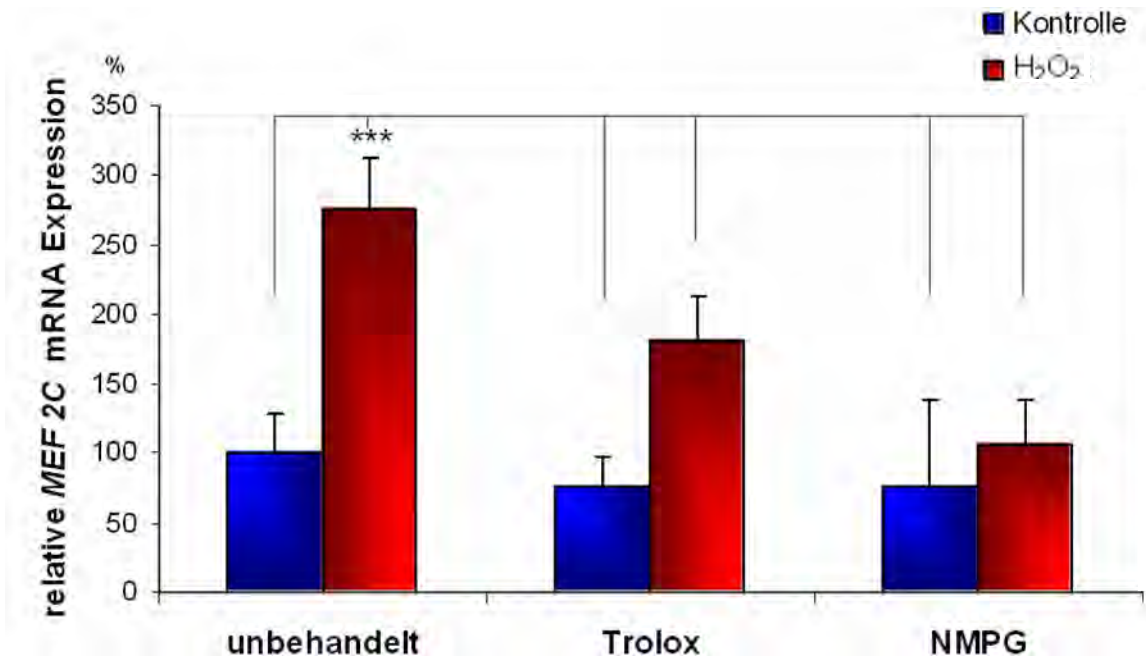
Da die bisherigen Ergebnisse dafür sprechen, dass die Kardiomyogenese der ES Zellen durch den intrazellulären Redoxstatus reguliert wird, wurde die ROS-abhängige mRNA-Expression der kardialen Transkriptionsfaktoren *MEF 2C*, *DTEF 1*, *GATA 4* und *Nkx 2.5* und des Wachstumsfaktors *BMP-10* untersucht. Die EBs wurden an Tag 4 der Differenzierung für 24 h mit 500 nM  $H_2O_2$  inkubiert. Anschließend wurde die mRNA isoliert. Um zu bestätigen, dass ROS an der Proliferation beteiligt sind, wurde der Einfluss der Radikalfänger Trolox und NMPG auf die durch  $H_2O_2$  induzierte Kardiomyogenese untersucht. Die Zellen wurden vor der Zugabe des  $H_2O_2$  für 2 h mit freien Radikalfängern vorinkubiert (Abb. 5.10).

Die Behandlung der EBs mit  $H_2O_2$  führte zu einer Stimulation der Transkriptionsfaktoren *MEF 2C*, *DTEF 1*, *GATA 4* und *Nkx 2.5* und des Wachstumsfaktors *BMP-10* ( $n = 4$ ).

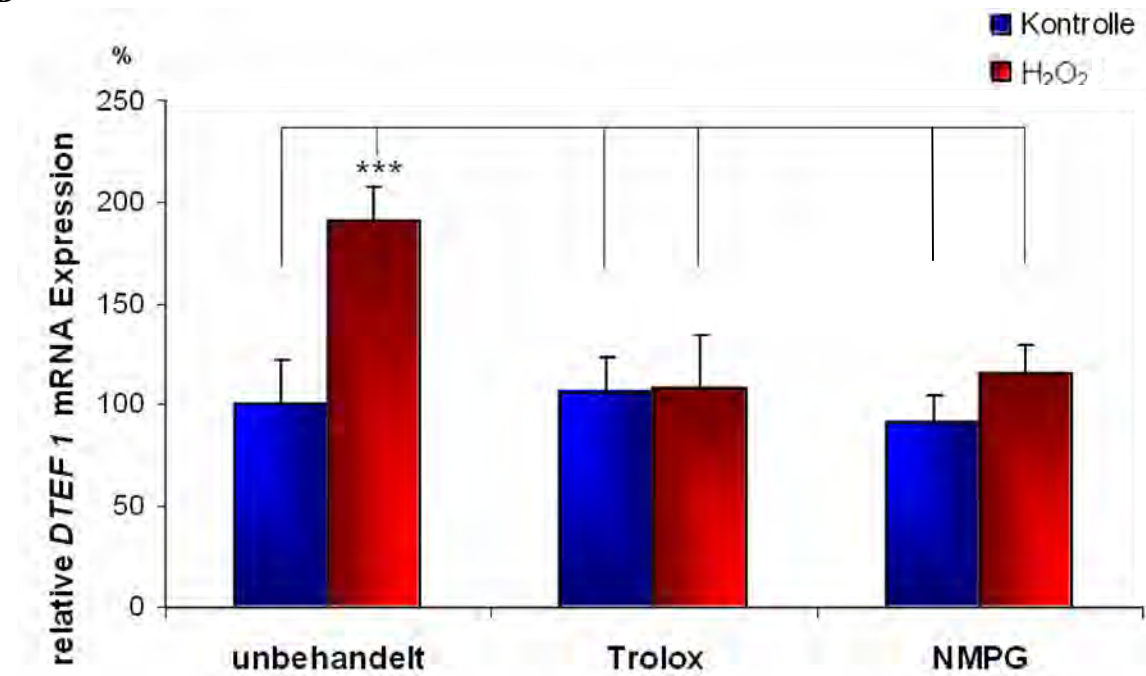
Bei *MEF 2C* (A) und *DTEF 1* (B) wurde der Effekt des  $H_2O_2$  auf die mRNA durch die freien Radikalfänger Trolox und NMPG signifikant inhibiert.

Im Gegensatz dazu wurde die Expression von *GATA 4* (C), *Nkx 2.5* (D) und *BMP-10* (E) in Anwesenheit der Radikalfänger verstärkt, teilweise sogar höher als bei den mit  $H_2O_2$  behandelten Proben. Da auch die Kontrollen, die nur mit den Radikalfängern behandelt wurden, hochreguliert sind, spricht das dafür, dass Redoxstress unabhängig von der absoluten ROS-Konzentration zu Stimulation von *GATA 4*, *Nkx 2.5* und *BMP-10* führt. In diesem System konnte kein Unterschied festgestellt werden, ob Radikale zugeführt ( $H_2O_2$ ) oder entzogen (Radikalfänger) wurden, die Gene wurden immer aktiviert.

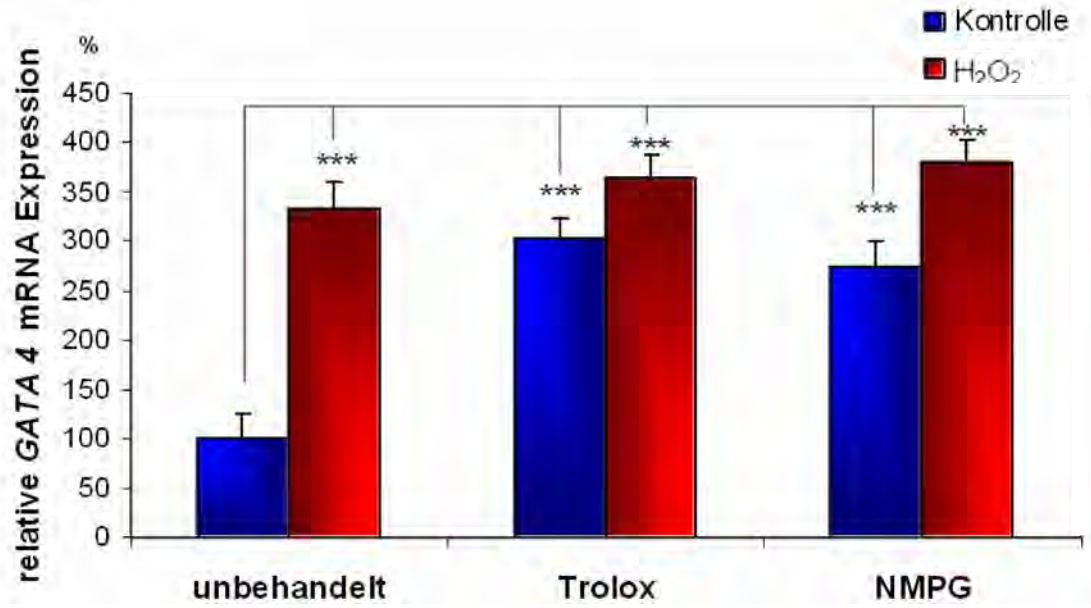
A



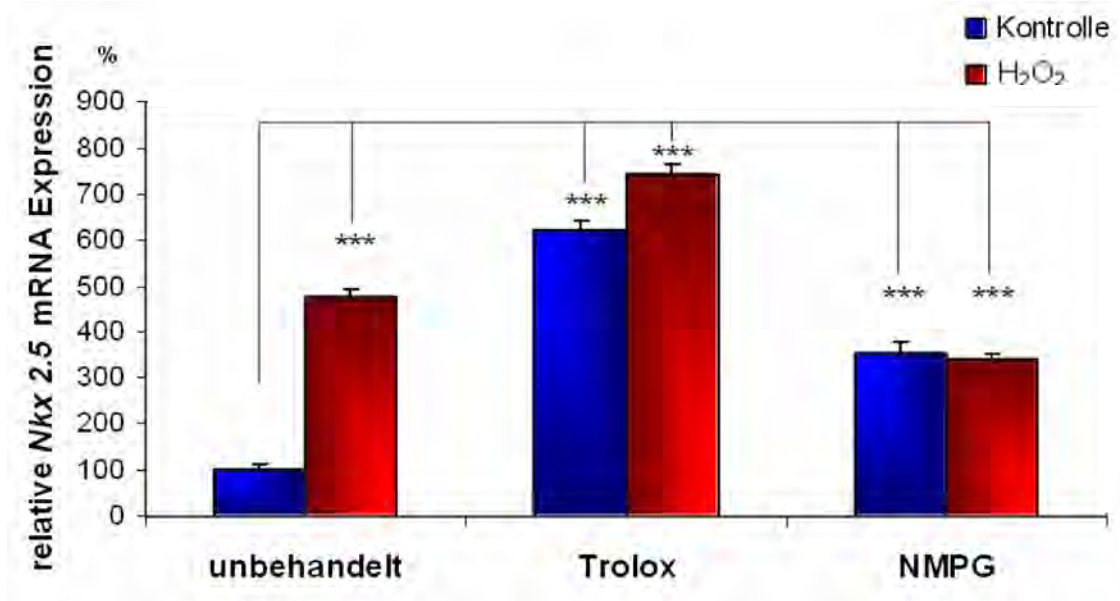
B



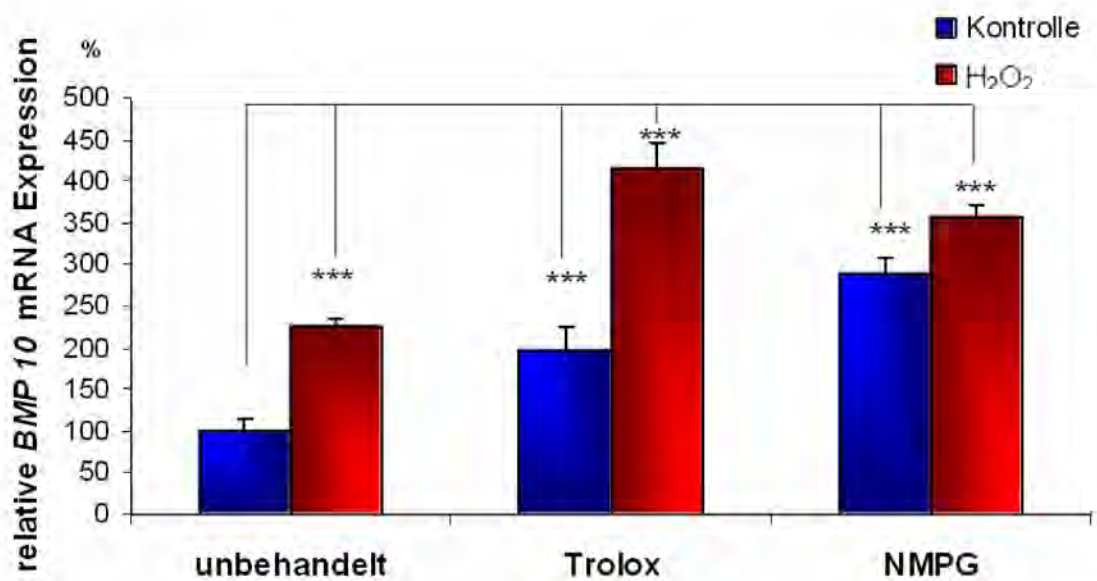
C



D



E



**Abb. 5.10:** Redox-sensitive Genaktivierung der herzspezifischen Transkriptionsfaktoren (A) *MEF 2C* ( $n \geq 4$ ), (B) *DTEF 1* ( $n = 4$ ), (C) *GATA 4* ( $n = 4$ ) und (D) *Nkx 2.5* ( $n = 4$ ) und (E) des an der Kardiomyozytenteilung beteiligten Wachstumsfaktors *BMP 10* ( $n = 4$ ) nach Behandlung mit 500 nM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> an Tag 4. Die Vorbehandlung der EBs mit den Radikalfängern Trolox und NMPG verhinderte die Aktivierung der Gene *MEF 2C* und *DTEF 1*, während die Gene von *GATA 4*, *Nkx 2.5* und *BMP 10* schon in Abwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktiviert wurden.

## 6 Diskussion

Solange keine ausreichenden Kenntnisse über die physiologischen Parameter, die das Überleben und die Proliferation von Herzmuskelzellen beeinflussen, vorhanden sind, wird es im Bereich der Zelltransplantation nur unbefriedigende Resultate geben. Obwohl embryonale Stammzellen in vielen Publikationen als vielversprechende Kardiomyozytenquelle für Transplantationen gelten, wurde bisher ihre Proliferationsfähigkeit nicht direkt mit anderen Zellen in einem vergleichbaren Differenzierungsstadium, z.B. embryonalen oder neonatalen Kardiomyozyten, verglichen. Obwohl allgemein Übereinstimmung darüber herrscht, dass Herzmuskelzellen kurz nach der Geburt aus bisher unbekanntem Gründen die Fähigkeit sich zu teilen verlieren, wurde bisher nicht genau untersucht, ob Kardiomyozyten, die aus differenzierten ES Zellen gewonnen wurden, eine ähnliche Verminderung der Proliferationsfähigkeit zeigen.

Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Ablauf des Zellzyklus der aus embryonalen Stammzellen gewonnenen Kardiomyozyten im Vergleich mit neonatalen Kardiomyozyten anhand verschiedener Proliferationsmarker (BrdU, Ki-67, Zyklin D1, pRb und p27<sup>KIP1</sup>) zu untersuchen.

Die Untersuchung der Zellzyklusaktivität von Kardiomyozyten erfordert eine geeignete experimentelle Nachweismethode. Es ist beispielsweise bekannt, dass adulte Kardiomyozyten Polyploidisierung und Karyokinese ohne Zytokinese durchführen. Die Bildung von Synzytien (vielkerniger Zellen) ist ein Kennzeichen der fertig ausdifferenzierten Kardiomyozyten. Daher können einige Bestandteile der Zellzyklusaktivität (z.B. DNA-Synthese, Expression der S-Phase-assoziierten Proteine) auch in Zellen vorhanden sein, die sich letzten Endes gar nicht teilen. Ein Nachteil vieler Zellzyklusmarker besteht darin, dass sie nur einen indirekten Nachweis der DNA-Synthese bieten und oft in sich nicht teilenden Zellen exprimiert werden. Die DNA-Synthese wird daher normalerweise durch Inkorporation modifizierter Deoxyribonukleotide (z.B. BrdU) nachgewiesen.

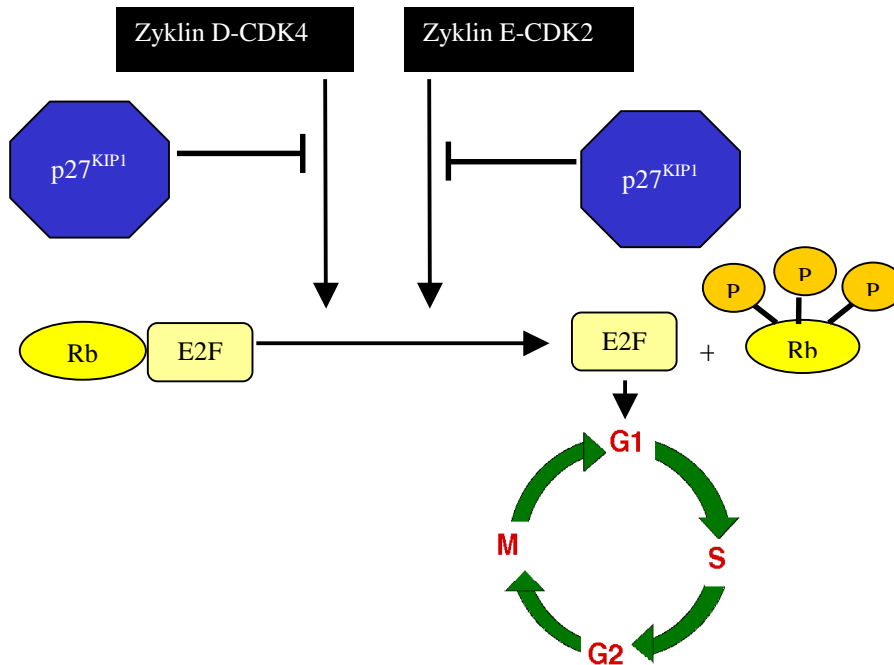
Es wurde schon früher in der Literatur gezeigt, dass in frühen Kardiomyozyten eine hohe Expression von Ki-67 im Kern nachweisbar ist, während es in späteren Stadien kaum exprimiert wird. Die biochemischen Eigenschaften dieses Proteins sind nur teilweise bekannt (MacCallum and Hall, 2000; Scholzen and Gerdes, 2000).

Bei proliferierenden Zellen in der G1/S-Phase wird Zyklin D1 in den Nukleus transportiert. In postmitotischen Kardiomyozyten werden auch Zyklin D1/CDK-Komplexe gebildet; diese bleiben aber im Zytoplasma (Costa et al., 1998). Wenn ES Zellen EBs bilden, erhöht sich die Zyklin D-Expression mit Einsetzen der Differenzierung, die G1-Phase des Zellzyklus wird länger und die Zellteilungsrate verlangsamt sich (Savatier et al., 1996). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass sowohl bei den aus ES Zellen gewonnenen Zellen als auch bei neonatalen Zellen bei proliferierenden Kardiomyozyten Zyklin D1 in den Kern transportiert wird, während es bei postmitotischen Herzmuskelzellen im Zytoplasma akkumuliert.

Bei Zellen, denen das Rb-Protein fehlt, ist die Menge an Zyklin D1 und Zyklin D1/CDK 4-Komplexen erniedrigt, während eine starke Expression des Rb-Proteins die Zyklin D1-Expression erhöht (Costa et al., 1998). Es scheint einen Feedback-Mechanismus zwischen der Phosphorylierung von Rb-Protein und der Synthese von Zyklin D1 zu geben. Das Rb wird durch die Phosphorylierung inaktiviert und der Transkriptionsfaktor E2F wird freigesetzt, wodurch die Zellen von der G1- in die S-Phase übergehen. Zellzyklusabhängige Phosphorylierung durch CDKs hemmt die Bindung von Rb und erlaubt dadurch die Progression des Zellzyklus (Lundberg and Weinberg, 1998). Knudsen und Wang zeigten 1997, dass die Inaktivierung des Rb und die nachfolgende Progression des Zellzyklus vermutlich eine Phosphorylierung erfordert, erst durch Zyklin D/CDK 4/6, gefolgt von Zyklin E/CDK 2.

Die Entscheidung den Zellzyklus weiterzuführen findet in der G2-Phase statt, in der zelluläre Ras die Erhöhung von Zyklin D1 induzieren. Diese erhöhten Konzentrationen bleiben während der Mitose-Phase und der G1-Phase bis zum Beginn der S-Phase bestehen, woraufhin das Zyklin D1-Niveau in niedrige Konzentrationen abfällt. Dieser Konzentrationsabfall während der S-Phase ist für die DNA-Synthese nötig, da durch hohen Zyklin D1-Gehalt die DNA-Synthese gehemmt wird (Pagano et al., 1994). Außerdem führt der Abfall des Zyklin D1-Niveaus dazu, dass die Zelle später eine verstärkte Expression des Zyklin D1-Gehalts zeigt, wenn sie wieder in die G2-Phase des Zellzyklus eintritt und weiter proliferiert. Sind die Bedingungen für eine Proliferation ungünstig, bleibt die Zyklin D1-Konzentration niedrig und die Zelle geht nach der Mitose in Zellruhe (Quieszenz) über. Durch diese benötigten Konzentrationsunterschiede des Zyklin D1 wird eine unkontrollierte Proliferation durch konstant hohe Konzentrationen des Zyklin D1 verhindert, wodurch jeder Zellzyklus kontrolliert wird (Nurse, 2002). Ähnlich verhält sich das p27<sup>KIP1</sup>, welches normalerweise in proliferierenden Zellen einen niedrigen Gehalt aufweist, während der G1-Phase aber für die Verbindung von Zyklin D1/CDK 4 benötigt wird. Auch hier ist eine

einfache Hemmung des  $p27^{KIP1}$ , die zu unkontrollierter Proliferation führen würde, nicht möglich.



**Abb. 6.1:** positive und negative Regulation des Zellzyklus durch Proliferationsmarker

Bei den durchgeführten Versuchen zeigt sich bei allen Proliferationsmarkern eine Inhibition des Zellzyklus nach etwa einer Woche. Bei Ki-67 nimmt die Expression in den Kardiomyozytenkernen ab, phosphoryliertes Rb kann nicht nachgewiesen werden und  $p27^{KIP1}$  wird stärker exprimiert. Zyklin D1 wird nach 5 - 7 Tagen nicht mehr in den Kern transloziert. Dies zeigt, dass die Zellen aufhören zu proliferieren. Da diese Proliferationsmarker, wie erwähnt, für den Nachweis der Proliferation unspezifisch sein können, wurden die Experimente durch eine Inkubation mit BrdU verifiziert. Die Behandlung der Zellen mit BrdU weist die gleichen Ergebnisse auf wie eine immunzytochemische Untersuchung auf die verschiedenen anderen Proliferationsmarker. Dies deutet darauf hin, dass sowohl die neonatalen Kardiomyozyten als auch die aus ES Zellen gewonnenen Herzmuskelzellen tatsächlich proliferieren.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse deutlich, dass die Proliferationsfähigkeit der Kardiomyozyten im Lauf der Zeit abnimmt. Kardiomyozyten, die aus ES Zellen isoliert wurden, verhalten sich ähnlich wie neonatale Kardiomyozyten. Nach etwa einer Woche konnte bei beiden Systemen keine Proliferation mehr nachgewiesen werden. Dies lässt es als



wahrscheinlich erscheinen, dass bei einer Transplantation von Kardiomyozyten, die aus ES Zellen gewonnen wurden, nach einem Herzinfarkt keine signifikante Proliferation der Zellen erwartet werden kann. Es würde eine sehr große Anzahl ausdifferenzierter Kardiomyozyten benötigt werden, um einen ausreichenden Gewebeersatz zu erzielen.

Eine starke Expression der induzierbaren (iNOS) und endothelialen NO-Synthasen (eNOS) wurde während der embryonalen Entwicklung des Herzens der Maus an Tag 9,5 beobachtet (Bloch et al., 1999). Diese Expression geht vor der Geburt zurück, was dafür spricht, dass eine Periode erhöhter Exposition mit NO für eine normale Entwicklung benötigt wird. Mäuse denen das eNOS-Gen entfernt wurde, zeigen schwere kongenitale Missbildungen des Herzens (Lee et al., 2000). Bei embryonalen Stammzellen wurde gezeigt, dass NOS-Inhibitoren eine Differenzierung zu Kardiomyozyten inhibieren, während NO-Donatoren die kardiale Differenzierung wieder ermöglichen (Bloch et al, 1999). Sowohl die Behandlung mit NO als auch eine Überexpression von iNOS erhöhen die Anzahl und die Größe der kontrahierenden Areale in EBs. Interessanterweise wurde von Kanno und Kollegen 2004 beobachtet, dass NO nicht nur die Differenzierung induziert, sondern auch in undifferenzierten Zellen zu Apoptose führt, was vermuten lässt, dass NO die kardiale Entwicklung sowohl durch eine Stimulation der Kardiomyogenese als auch durch eine Apoptose der Zellen, die nicht an der kardialen Entwicklung beteiligt sind, beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass NO auf isolierte Kardiomyozyten die gleichen Effekte hat wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Nachdem die Dauer der Proliferationsfähigkeit überprüft worden war, wurden verschiedene Möglichkeiten, den Zellzyklus zu reaktivieren, untersucht. Eine Behandlung mit ROS führt sowohl bei aus ES Zellen differenzierten Kardiomyozyten als auch bei neonatalen Kardiomyozyten zu einem Wiedereintritt in den Zellzyklus, wie die immunzytochemischen Färbungen auf BrdU, Zyklin D1, Ki-67, pRb und p27<sup>KIP1</sup> deutlich zeigen. Dies spricht für ähnliche Regulierungsmechanismen des Zellzyklus durch ROS in beiden Systemen.

Darüber hinaus verhinderte das Vorinkubieren der ES-Zell-abgeleiteten und neonatalen Herzmuskelzellen mit freien Radikalfängern die Stimulation des Zellzyklus der Kardiomyozyten. Auch das zeigt die Bedeutsamkeit von ROS bei der Kontrolle der Zellzyklusproliferation.

Es ist bekannt, dass ROS regulatorische Funktionen in aeroben Zellen wahrnehmen. ROS werden ständig bei verschiedenen Stoffwechselfvorgängen in unterschiedlichen

Kompartimenten der Zelle freigesetzt (Müller et al., 2000). Aus Studien mit Nicht-Kardiomyozyten ist bekannt, dass ROS nicht nur Zellschäden induzieren, sondern auch in anderen Prozessen, wie z.B. Zellproliferation, Apoptose, Genexpression und Seneszenz eine Rolle spielen (Droge, 2002). Intrazelluläre Änderungen des Redoxstatus können zur spezifischen Aktivierung von Genen und Enzymen, zur DNA-Synthese und zu Wachstumsänderungen führen (Müller et al., 2000). Bei Kardiomyozyten wurden die Wirkungen der ROS im nanomolaren Bereich bisher kaum untersucht. Dagegen ist allgemein bekannt, dass ROS in hohen Konzentrationen an verschiedenen kardialen Erkrankungen beteiligt sind, z.B. Bluthochdruck, Atherosklerose, kardiale Hypertrophie und Herzversagen. Oxidativer Stress wird auch mit anderen Erkrankungen wie Krebs und Alzheimer in Verbindung gebracht.

Es gibt verschiedene Quellen der ROS, z.B. Mitochondrien, NADPH-Oxidasen, Xanthinoxidase, Cyclooxygenase und Lipoxigenase (Bachschmid, Schildknecht und Ullrich, 2005). Bei embryonalen Stammzellen werden ROS überwiegend durch Homologe der Phagozyten-NADPH-Oxidase generiert (Sauer et al., 1999).

Im Gegensatz zu Endothelzellen und glatten Muskelzellen, bei denen die Expression und physiologische Funktion der NADPH-Oxidase detailliert untersucht wurde (Griendling, 2004), sind die Ursprünge der ROS in kardialen Zellen und die Aufgabe der NADPH-Oxidase während der embryonalen Entwicklung kaum beschrieben. Die meisten Untersuchungen befassen sich mit der Bedeutung des oxidativen Stresses in der Pathophysiologie des Herzens. Bei Herzerkrankungen des Menschen wird eine erhöhte Aktivität der myokardialen NADPH-Oxidase gefunden. Die NADPH-Oxidase-Untereinheiten NOX 2, *p22phox*, *p47phox* und *p67phox* werden alle sowohl in gesunden als auch in insuffizienten Herzen exprimiert. Im Gegensatz zu gesunden Herzen sind sie bei insuffizienten Herzen signifikant erhöht (Heymes et al., 2003). Auch Krijnen und Kollegen (2003) bewiesen, dass NOX 2 in humanen Kardiomyozyten exprimiert und während eines akuten Herzinfarktes hochreguliert wird. Von der NADPH-Oxidase gebildete ROS werden als Ursache für ventrikuläre Dysfunktion angesehen, die in kongestivem Herzversagen endet (Warnholtz and Munzel, 2003). Es wurde gezeigt, dass eine Aktivierung der NADPH-Oxidase während der Linksherzhypertrophie stattfindet, die zu pathophysiologischen Veränderungen und damit zur Progression des Herzversagens führen kann (Li et al., 2002). Amin und Kollegen (2001) zeigten, dass ROS die  $\alpha$ -adrenerge rezeptorstimulierte Hypertrophie in Kardiomyozyten adulter Ratten vermitteln.

Es wurde schon früher angenommen, dass während einer Herzerkrankung Signalwege, die während der embryonalen Entwicklung gebildet worden waren, reaktiviert werden. In adulten amitotischen Kardiomyozyten werden ROS sowohl durch mechanische als auch durch biochemische Stimuli generiert und induzieren hypertrophes Wachstum, das von einer Reaktivierung eines embryonalen Genprogramms begleitet wird (Kuwahara et al., 2003). Daher kann eine Aktivierung der NADPH-Oxidase während einer Kardiomyopathie einen Stimulus für die Aktivierung des Zellzyklus bedeuten, der, wie in dieser Studie gezeigt wurde, ausreicht, den Zellzyklus in den aus embryonalen Stammzellen gewonnenen Kardiomyozyten und in neonatalen Kardiomyozyten zu aktivieren. Vermutlich reicht dieser Stimulus aber nicht aus, eine Zellteilung in den Herzen adulter Individuen zu erreichen.

Es wird vermutet, dass eine durch leichte Änderung des Redoxgleichgewichts ausgelöste Aktivierung der kardialen Transkriptionsfaktoren für eine korrekte Induktion der Kardiomyogenese in ES Zellen benötigt wird. Wie schon früher gezeigt wurde, können vergleichbare Änderungen des intrazellulären Redoxstatus der kardialen Zellen und Gewebe während eines Herzinfarktes, einer Entzündung, Hypertrophie und Herzversagens auftreten (Sauer and Wartenberg, 2005). Daher besteht die Möglichkeit, dass eine Änderung des intrazellulären ROS-Gleichgewichts nicht nur die kardiale Differenzierung der ES Zellen stimuliert, sondern ebenso ein Signal enthält, das residente Stammzellen des Herzens dazu anregt, sich zu teilen und zu reifen Kardiomyozyten zu differenzieren. Es ist auch möglich, dass durch ROS, die bei einer Gewebeverletzung generiert werden, zirkulierende Stammzellen an den Ort der Entzündung gelockt werden, wodurch eine Reparatur des Herzens ermöglicht werden würde.

Die Behandlung sowohl der aus ES Zellen gewonnenen Kardiomyozyten als auch der neonatalen Herzmuskelzellen mit  $H_2O_2$  steigerte die Proteinexpression der NADPH-Oxidase-Untereinheiten MOX 1, NOX 4, *p22phox*, *p47phox* und *p67phox*. Das weist darauf hin, dass eine Anregung des Zellzyklus durch ROS-Generierung nötig ist, um eine längere Zellzyklusaktivität der Kardiomyozyten zu gewährleisten.

Um zu überprüfen, ob auch die Kardiomyogenese der ES Zellen durch ROS beeinflusst wird, wurden differenzierende EBs mit  $H_2O_2$  behandelt. Dies sollte das Verständnis der Kardiomyogenese der ES Zellen und der Kontrolle der embryonalen Differenzierung und Proliferation der Kardiomyozyten erhöhen. Das Behandeln von Zellen mit ROS wie z.B.  $H_2O_2$  und  $O_2^{\cdot-}$  wird von einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Effekte begleitet (Miller and Britigan, 1995). Es wurde in der Literatur bereits angegeben, dass die Fähigkeit

der ES Zellen, zu Kardiomyozyten zu differenzieren, vom Redoxstatus der differenzierenden Zellen abhängt. Es wird angenommen, dass die Kardiomyogenese embryonaler Stammzellen sowohl durch ROS als auch durch NO stimuliert wird. Kardiomyogenese kann durch geringe Mengen exogen zugeführter ROS induziert werden, während eine Vorinkubation mit freien Radikalfängern die Differenzierung der ES Zellen zu Kardiomyozyten signifikant inhibiert (Sauer et al., 1999). Diese Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Exogen zugeführte ROS stimulierten schon in nanomolaren Konzentrationen die Kardiomyogenese der ES Zellen. Zusätzlich wurde die Anzahl der EBs mit spontan kontrahierenden Arealen durch Vorbehandlung mit Trolox und NMPG reduziert. Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung der ROS bei der Kardiomyogenese.

Auch bei der Kardiomyogenese der ES Zellen scheinen die ROS durch NADPH-Oxidasen generiert zu werden, da die Expression von *NOX 1* und *NOX 4* mRNA signifikant erhöht wurde. Da auch ohne exogen zugeführte ROS bis zu einem gewissen Grad Kardiomyogenese stattfindet, wird angenommen, dass differenzierende Stammzellen in der Lage sind, während der Kardiomyogenese selbst endogene ROS zu generieren (Schmelter et al., 2006). Das wurde in den hier durchgeführten Versuchen bestätigt, da auch ohne Induktion der ROS-Generierung durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die verschiedenen NADPH-Oxidase-Untereinheiten nachgewiesen werden konnten.

Der Einfluss der durch NADPH-Oxidase generierten ROS auf die Kardiomyogenese embryonaler Stammzellen wurde durch Experimente bestätigt, bei denen dieses Enzym durch Apocynin und DPI inhibiert wurde. Beide NADPH-Oxidase-Inhibitoren verhinderten signifikant die Differenzierung zu Kardiomyozyten, was ebenfalls auf eine Rolle der NADPH-Oxidase in der Kardiomyogenese der ES Zellen hinweist.

Die Dysregulation verschiedener kardialer Gene in insuffizienten Herzen führt zu einer biochemischen, strukturellen, funktionellen und elektrischen Veränderung des Herzens, allerdings ist über die molekularen Kreisläufe, welche für diesen Umbau verantwortlich sind, bisher wenig bekannt (Kuwahara et al., 2003). Eine der charakteristischen genetischen Veränderungen in hypertrophen und insuffizienten Herzen ist die Reaktivierung eines embryonalen kardialen Genprogramms, das sowohl zu einer Stimulation der kardialen Gene ANP und BNP (brain natriuretic peptide) als auch zu einer Erhöhung der kontraktilen Proteine  $\alpha$ -CA und  $\beta$ -MHC führt. In der Tat ist die Produktion von ANP und BNP in hypertrophen und insuffizienten Herzen signifikant erhöht und kann daher als prognostischer Maßstab der Schwere der Erkrankung dienen (Kjær and Hesse, 2001).

Neben einer Stimulation der Kardiomyogenese durch exogen zugeführte ROS wurde nicht nur die Anzahl der Embryonalkörperchen mit kontrahierenden Arealen erhöht, sondern mittels FACS-Analysen konnte auch eine Steigerung der Gesamtzahl der Kardiomyozyten innerhalb der EBs festgestellt werden.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren, die an der Kardiomyogenese beteiligt sind, ebenso erhöht werden wie die kardiomyozytenspezifischen Gene. Eine Behandlung der EBs mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren *MEF 2C*, *DTEF 1*, *GATA 4* und *Nkx 2.5* und des Wachstumsfaktors *BMP-10*, und der kardialen Gene *α-CA*, *ANP*, *β-MHC*, *MLC 2a* und *MLC 2v*; *α-MHC* konnte nicht nachgewiesen werden. Dies ist kein Widerspruch zu den übrigen Ergebnissen, sondern in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass *α-MHC* in adulten Ventrikeln kleiner Säugetiere überwiegt (80 - 90%), wohingegen während der embryonalen und fetalen Entwicklung *β-MHC* die vorherrschende Isoform ist, also auch bei embryonalen Stammzellen (Mansén et al., 2001).

Die Stimulation der mRNA-Expression von *MEF 2C* und *DTEF 1* wurde in Anwesenheit der freien Radikalfänger signifikant inhibiert. Interessanterweise führte die Vorbehandlung mit freien Radikalfängern schon in Abwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Expression von *GATA 4*, *Nkx 2.5* und *BMP-10* und induzierte nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> einen weiteren Anstieg der mRNA-Expression. Das lässt darauf schließen, dass diese Faktoren eher durch Änderungen des Redoxpotentials als durch absoluten Anstieg oder Abfall des intrazellulären ROS-Gehalts reguliert werden. Das auf das Herz beschränkte Zytokin BMP-10 wird für die normale Expression verschiedener kardiogener Schlüsselfaktoren, z.B. *Nkx 2.5*, im sich entwickelnden Myokard benötigt (Chen et al., 2004). Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse besteht darin, dass durch die Änderung des Redoxgleichgewichts die mRNA-Expression des *BMP-10* stimuliert wurde, was dann zu einem Anstieg der nachgeordneten Transkriptionsfaktoren führte. Die Expression der Transkriptionsfaktoren *GATA 4* und *Nkx 2.5*, die zu den frühesten Markern der kardiomyozytären Zelldifferenzierung gehören, wird wechselseitig in den frühen Phasen der Herzentwicklung verstärkt (Garg et al., 2003). Daher sind beide Transkriptionsfaktoren gleichermaßen stimuliert.

MEF 2 Proteine wirken als Kofaktoren für die gewebegebundenen GATA Zinkfingerproteine in der Kardiomyogenese (Morin et al., 2000), sie sind also GATA vorgeschaltet, was eine mögliche Erklärung dafür ist, dass *MEF 2C* nicht durch eine reine Zugabe der Radikalfänger stimuliert wurde.

Insgesamt zeigt diese Studie, dass durch ROS-Konzentrationen im nanomolaren Bereich sowohl ES-Zell-abgeleitete als auch neonatale Kardiomyozyten dazu angeregt werden, wieder in den Zellzyklus einzutreten. Auch die Kardiomyogenese der ES Zellen wird durch geringe ROS-Konzentrationen stimuliert. Die NADPH-Oxidase scheint in die kardiovaskuläre Differenzierung der ES Zellen involviert zu sein.

## 7 Zusammenfassung

Kurz nach der Geburt verlieren Kardiomyozyten ihre Proliferationsfähigkeit, das weitere Wachstum des Herzen erfolgt durch Hypertrophie. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Proliferationsfähigkeit der Kardiomyozyten von embryonalen Stammzellen (ES Zellen) mit der neonataler Kardiomyozyten der Maus verglichen und der Effekt reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) auf die Proliferationsfähigkeit und die Kardiomyogenese untersucht. Geringe Konzentrationen  $H_2O_2$  stimulierten die Kardiomyogenese von ES Zellen und induzierten die Zellproliferation der Kardiomyozyten, die aus ES Zellen und neonatalen Kardiomyozyten gewonnen wurden. Dies wurde anhand der Inkorporation von BrdU, der Steigerung der Ki-67-Expression, der Kerntranslokation von Zyklin D1, der Phosphorylierung des Retinoblastoms (Rb) und der verminderten Expression des  $p27^{KIP1}$  untersucht. Die beobachteten Effekte wurden in Anwesenheit der freien Radikalfänger Trolox und NMPG aufgehoben. In ES Zellen führte die Zugabe von ROS zu einer Expressionssteigerung der kardialen Gene  $\alpha$ -CA, ANP,  $\beta$ -MHC, MLC 2a und MLC 2v, der herzspezifischen Transkriptionsfaktoren MEF 2C, DTEF 1, GATA 4 und Nkx 2.5 und des bei der Kardiomyogenese involvierten Wachstumsfaktors BMP-10. Die Behandlung der Kardiomyozyten mit ROS führte sowohl zu einer Steigerung der Proteinexpression der NADPH-Oxidase-Untereinheiten MOX 1, NOX 4, p22phox, p47phox und p67phox als auch zu einer Steigerung der NOX 1 und NOX 4 mRNA, was für eine vorwärtsgerichtete Regulation der ROS-Generierung spricht. Dem entsprechend verhinderte eine Inhibierung der NADPH-Oxidase durch DPI und Apocynin die ROS-induzierte Kardiomyogenese der ES Zellen. Die Daten sprechen dafür, dass bei der Proliferation der neonatalen und ES-Zell-abgeleiteten Kardiomyozyten ROS-vermittelte Signalkaskaden involviert sind und dass die NADPH-Oxidase die kardiovaskuläre Differenzierung der ES Zellen beeinflusst.

## 8 Summary

Shortly after birth the proliferation of cardiac cells declines by so far unknown reasons, and further growth of the heart occurs by hypertrophic cell growth. In the present study the cell proliferation capacity of mouse embryonic stem cells versus mouse neonatal cardiomyocytes and the effects of reactive oxygen species on cardiomyogenesis and cardiac cell proliferation of ES cells was investigated. Low levels of ROS stimulated cardiomyogenesis and induced cell proliferation of ES-cell-derived and mouse neonatal cardiomyocytes as investigated by nuclear translocation of cyclin D1, downregulation of p27KIP1, phosphorylation of retinoblastoma, increase of Ki-67 expression and incorporation of BrdU. The observed effects were blunted in the presence of the free radical scavengers trolox and NMPG. In ES cells exogenous ROS induced the expression of the cardiac-specific genes  $\alpha$ -CA, ANP,  $\beta$ -MHC, *MLC 2a* and *MLC 2v* as well as the cardiac-specific transcription factors *MEF 2C*, *DTEF 1*, *GATA 4* and *Nkx 2.5* and the cardiomyogenesis-associated growth factor *BMP-10*.

Treatment of cardiac cells with ROS increased *MOX 1*, *NOX 4*, *p22phox*, *p47phox* and *p67phox* protein as well as *NOX 1* and *NOX 4* mRNA, indicating feed-forward regulation of ROS generation. Consequently, inhibition of NADPH oxidase with DPI and apocynin totally abolished ROS-induced cardiomyogenesis of ES cells. In summary, the data suggest that proliferation of neonatal and ES cell-derived cardiac cells involves ROS-mediated signalling cascades and point toward an involvement of NADPH oxidase in cardiovascular differentiation of ES cells.



## 9 Literaturübersicht

Abo A., Pick E.: Purification and characterization of a third cytosolic component of the superoxide-generating NADPH oxidase of macrophages.

*J Biol Chem* **266**:23577-23585, 1991

Amin J.K., Xiao L., Pimental D.R., Pagano P.J., Singh K., Sawyer D.B., Colucci W.S.: Reactive oxygen species mediate alpha-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes.

*J Mol Cell Cardiol* **33**:131-139, 2001

Andrianopoulos A., Timberlake W.E.: ATTS, a new and conserved DNA binding domain.

*Plant Cell* **3**:747-748, 1991

Azacie A., Lamont L., Fineman J.R., He Y.: Divergent transcriptional enhancer factor-1 regulates the cardiac troponin T promoter.

*Am J Physiol Cell Physiol.* **289**(6):C1522-1534, 2005

Azacie A., Larkin S.B., Farrance I.K., Grenningloh G., Ordahl C.P.: DTEF-1, a novel member of the transcription enhancer factor-1 (TEF-1) multigene family.

*J Biol Chem* **271**:8260-8265, 1996

Babior B.M.: Phagocytes and oxidative stress.

*Am J Med* **109**(1):33-44, 2000

Bachschnid M., Schildknecht S., Ullrich V.: Redox regulation of vascular prostanoid synthesis by the nitric oxide-superoxide system.

*Biochem Biophys Res Commun* **338**(1):536-542, 2005

Bayraktukan U., Draper N., Lang D., Shah A.M.: Expression of functional neutrophil-type NADPH oxidase in cultured rat coronary microvascular endothelial cells.

*Cardiovascular Res* **38**:256-262, 1998

Beltrami A.P., Urbanek K., Kajstura J., Yan S.M., Finato N., Bussani R., Nadal-Ginard B., Silvestri F., Leri A., Beltrami C.A., Anversa P.: Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction.

*N Eng J Med* **344**:1750-1757, 2001

Berk B.C.: Redox signals that regulate the vascular response to injury.

*Thromb Haemost* **82**(2):810-817, 1999

Black B.L., Olson E.N.: Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins.

*Annu Rev Cell Dev Biol* **14**:167-196, 1998

Bloch W., Addicks K., Hescheler J., Fleischmann B.K.: Nitric oxide synthase expression and function in embryonic and adult cardiomyocytes.

*Microsc Res Tech* **55**:259-269, 2001

Bloch W., Fleischmann B.K., Lorke D.E., Andressen C., Hops B., Hescheler J., Addicks K: Nitric oxide synthase expression and role during cardiomyogenesis.

*Cardiovasc Res* **43**:675-684, 1999

Blyszczuk P., Wobus A.M.: In vitro differentiation of embryonic stem cells into the pancreatic lineage.

*Methods Mol Biol* **330**:373-85, 2006

Boheler K.R., Czyz J., Tweedie D., Yang H.T., Anisimov S.V., Wobus A.M.: Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes.

*Circ Res* **91**:189-201, 2002

Brand T.: Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis.

*Dev Biol* **258**:1-19, 2003

Buesen R., Visan A., Genschow E., Slawik B., Spielmann H., Seiler A.: Trends in improving the embryonic stem cell test (EST): an overview.

*ALTEX* **21**(1):15-22, 2004

Burdon T., Chambers I., Stracey C., Niwa H., Smith A.: Signaling mechanisms regulating self-renewal and differentiation of pluripotent embryonic stem cells.

*Cells Tissue Organs* **165**:131-143, 1999

Cai H., Harrison D.G.: Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress.

*Circ Res* **87**(10):840-844, 2000

Chance B., Sies H., Boveris A.: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.

*Physiol Rev* **59**(3):527-605, 1979

Chandel N. S., Schumacker P. T.: Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight.

*J Appl Physiol* **88**:1880-1889, 2000

Chandel N.S., Schumacker P. T., Arch R.H.: Reactive oxygen species are downstream products of TRAF-mediated signal transduction.

*J Biol Chem* **276**(46):42728-42736, 2001

Chandel N.S., McClintock D.S., Feliciano C.E., Wood T.M., Melendez J.A., Rodriguez A.M., Schumacker P. T.: Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  during hypoxia: a mechanism of O<sub>2</sub> sensing.

*J Biol Chem* **275**(33):25130-25138, 2000

Chen H., Shi S., Acosta L., Li W., Lu J., Bao S., Chen Z., Yang Z., Schneider M.D., Chien K.R., Conway S.J., Yoder M.C., Haneline L.S., Franco D., Shou W.: BMP 10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis.

*Development* **131**:2219-2231, 2004

Choi S.-C., Yoon J., Shim W.-J., Ro Y.-M., Lim D.-S.: 5-azacytidine induces cardiac differentiation of P19 embryonic stem cells.

*Exp Mol Med* **36**(6):515-523, 2004

Clubb F.J. Jr, Bishop S.P.: Formation of binucleated myocardial cells in the neonatal rat. An index for growth hypertrophy.

*Lab Invest* **50**:571-577, 1984

Condliffe A.M., Hawkins P.T., Stephens L.R., Haslett C., Chilvers E.R.: Priming of human neutrophil superoxide generation by tumour necrosis factor-alpha is signalled by enhanced phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate but not inositol 1,4,5-trisphosphate accumulation.

*FEBS* **439**(1-2):147-151, 1998

Costa S.D., von Minckwitz G., Jansen-Dürr P., Sinn H.-P., Kaufmann M.: Cyclins and Breast Cancer.

*Onkologie* **21**:28-34, 1998

Curnutte J.T., Kuver R., Babior B.M.: Activation of the respiratory burst oxidase in a fully soluble system from human neutrophils.

*J Biol Chem* **262**(14):6450-6452, 1987

Daiber A., Ullrich V.: Radikalchemie im Organismus: Stickstoffmonoxid, Superoxid und Peroxynitrit.

*Chem i u Zeit* **6**:366-375, 2002

De Flora S., Izzotti A., D'Agostini F., Cesarone C.F.: Antioxidant activity and other mechanisms of thiols involved in chemoprevention of mutation and cancer.

*Amer J Med* **91**:122S-130S, 1991

DeLeo F.R., Quinn M.T.: Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins.

*J Leukoc Biol* **60**:677-691, 1996.

Dentice M., Luongo C., Elefante A., Romino R., Ambrosio R., Vitale M., Rossi G., Fenzi G., Salvatore D.: Transcription factor Nkx-2.5 induces sodium/iodide symporter gene expression and participates in retinoic acid- and lactation-induced transcription in mammary cells.

*Mol Cell Biol* **24**(18):7863-7877, 2004

Di Lisi R., Millino C., Calabria E., Altruda F., Schiaffino S., Ausoni S.: Combinatorial *cis*-acting elements control tissue-specific activation of the cardiac troponin I gene in vitro and in vivo.

*J Biol Chem* **273**:25371-25380, 1998

Dreher D., Junod A.F.: Differential effects of superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical on intracellular calcium in human endothelial cells.

*J Cell Physiol* **162**(1):147-153, 1995

Droge W.: Free radicals in the physiological control of cell function.

*Physiol Rev* **82**:47-95, 2002

Ducy P., Karsenty G.: The family of bone morphogenetic proteins.

*Kidney International* **57**:2207-2214, 2000

Dyson N.: The regulation of E2F by pRB-family proteins.

*Genes Dev* **12**(15):2245-2262, 1998

Evans M.J., Kaufman M.H.: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.

*Nature* **292**:154-156, 1981

Gabbita S.P., Robinson K.A., Stewart C.A., Floyd R.A., Hensley K.: Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction.

*Arch Biochem Biophys* **376**:1-13, 2000

Garg V., Kathiriya I.S., Barnes R., Schluterman M.K., King I.N., Butler C.A., Rothrock C.R., Eapen R.S., Hirayama-Yamada K., Joo K., Matsuoka R., Cohen J.C., Srivastava D.: GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5.

*Nature* **424**:443-447, 2003

Goldkorn T., Balaban N., Matsukuma K., Chea V., Gould R., Last J., Chan C., and Chavez C.: EGF-Receptor phosphorylation and signaling are targeted by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> redox stress.

*Am J Resp Mol Biol* **15**(5):786-789, 1998

Gore S.D., Wenig L.J., Burke P.J.: Validation of flow-cytometric determination of Ki-67 expression as a measure of growth factor response in acute myelogenous leukaemia.

*Exp Hematol* **21**:1702-1708, 1993

Griendling K.K.: Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system.

*Heart* **90**:491-493, 2004

Griendling K.K., Minieri C.A., Ollerenshaw J.D., Alexander R.W.: Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells.

*Circ Res* **74**(6):1141-1148, 1994

Griendling K.K., Sorescu D., Lassegue B., Ushio-Fukai M.: Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology.

*Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**:2175-2183, 2000

Hailstones D., Barton P., Chan-Thomas P., Sasse S., Sutherland C., Hardeman E., Gunning P.: Differential regulation of the atrial isoforms of the myosin light chains during striated muscle development.

*J Biol Chem* **267**(32):23295-300, 1992

Harper R.W., Xu C., Eiserich J.P., Chen Y., Kao C.Y., Thai P., Setiadi H., Wu R.: Differential regulation of dual NADPH oxidases/peroxidases, Duox1 and Duox2, by Th1 and Th2 cytokines in respiratory tract epithelium.

*FEBS Lett* **579**:4911-4917, 2005

Harris B.S., Gourdie R.G., O'Brien T.X.: Atrioventricular conduction system and transcription factors Nkx2.5 and Msx2.

*J Cardiovasc Electrophysiol* **16**(1):86-87, 2005

Haugland R.P.:

*Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Sixth Edition, p.46, 1996

Hautala N., Takola H., Luodonpaa M., Puhakka J., Romppanen H., Vuolteenaho O., Ruskoaho H.: Pressure overload increases GATA4 binding activity via endothelin-1.

*Circulation* **103**:730-735, 2001

Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury.

*Free Radic Biol Med* **28**(10):1456-1462, 2000.

Hescheler J., Fleischmann B.K., Lentini S., Maltsev V.A., Rohwedel J., Wobus A.M., Addicks K.: Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis.

*Cardiovasc Res* **36**:149-162, 1977

Hescheler J., Fleischmann B.K., Wartenberg M., Bloch W., Kolossov E., Ji G., Addicks K., Sauer H.: Establishment of ionic channels and signalling cascades in the embryonic stem cell-derived primitive endoderm and cardiovascular system.

*Cells Tissues Organs* **165**:153-164, 1999

Heymes C., Bendall J.K., Ratajczak P., Cave A.C., Samuel J.L., Hasenfuss G., Shah A.M.: Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure.

*J Am Coll Cardiol* **41**:2164-2171, 2003

Hirai H., Roussel M.F., Kato J., Ashmun R.A., Sherr C.J.: Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6.

*Mol Cell Biol* **15**:2672-2681, 1995

Hoehn M., Küstermann E., Blunk J., Wiedermann D., Trapp T., Wecker S., Föcking S., Arnold H., Hescheler J., Fleischmann B., Schwindt W., Bührle C.: Monitoring of implanted stem cell migration *in vivo*: A highly resolved *in vivo* magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat.

*PNAS* **99**(25):16267-16272, 2002

Hohler B., Holzzapfel B., Kummer W.: NADPH oxidase subunits and superoxide production in porcine pulmonary artery endothelial cells.

*Histochem Cell Biol* **114**(1):29-37, 2000

Isenberg G., Klöckner U.: Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a „KB medium“.

*Pflügers Arch* **359**:6-18, 1982

Kanno S., Kim P.K., Sallam K., Lei J., Billiar T.R., Shears L.L.: Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells.

*Proc Natl Acad Sci USA* **101**:12277-12281, 2004

Kehat I., Gepstein A., Spira A., Itskovitz-Eldor J., Gepstein L.: High-resolution electrophysiological assessment of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: a novel *in vitro* model for the study of conduction.

*Circ Res* **91**:659-661, 2002

Kindblom L.G., Ahlden M., Meis-Kindblom J.M., Stenman G.: Immunohistochemical and molecular analysis of p53, MDM2, proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in benign and malignant peripheral nerve sheath tumors.

*Virchows Arch* **427**:19-26, 1995

Kjær A., Hesse B.: Heart failure and neuroendocrine activation: diagnostic, prognostic and therapeutic perspectives.

*Clin Physiol* **21**(6):661-672, 2001



Knudsen E.S., Wang J.Y.: Dual mechanisms for the inhibition of E2F binding to RB by cyclin-dependent kinase-mediated RB phosphorylation.

*Mol Cell Biol* **17**:5771-5783, 1997

Krause K.H.: Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADDP oxidases.

*Jpn J Infect Dis* **57**:S28-29, 2004

Krieger-Brauer H.I., Kather H.: Antagonistic effects of different members of the fibroblast and platelet-derived growth factor families on adipose conversion and NADPH-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in 3T3 L1-cells.

*Biochem J* **307**:549-556, 1995

Krijnen P.A., Meischl C., Hack C.E., Meijer C.J., Visser C.A., Ross D., Niessen H.W.: Increased Nox 2 expression in human cardiomyocytes after acute myocardial infarction.

*J Clin Pathol* **56**(3):194-199, 2003

Kubalak S.W., Miller-Hance W.C., O'Brien T.X., Dryson E., Chien K.R.: Chamber specification of atrial myosin light chain-2 expression precedes septation during murine cardiogenesis.

*J Biol Chem* **269**(24):16961-16970, 1994

Küstermann E., Roell W., Breitbach M., Wecker S., Wiedermann D., Buehrle C., Welz A., Hescheler J., Fleischmann B.K., Hoehn M.: Stem cell implantation in ischemic mouse heart: a high-resolution magnetic resonance imaging investigation.

*NMR Biomed* **18**:362-370, 2005

Kulisz A., Chen N., Chandel N.S., Shao Z., Schumacker P.T.: Mitochondrial ROS initiate phosphorylation of p38 MAP kinase during hypoxia in cardiomyocytes.

*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **282**:L1324-1329, 2002

Kuwahara K., Saito Y., Takano M., Arai Y., Yasuno S., Nakagawa Y., Takahashi N., Adachi Y., Takemura G., Horie M., Miyamoto Y., Morisaki T., Kuratomi S., Noma A., Fujiwara H., Yoshimasa Y., Kinoshita H., Kawakami R., Kishimoto I., Nakanishi M., Usami S., Saito Y., Harada M., Nakao K.: NRSF regulates the fetal cardiac gene program and maintains normal cardiac structure and function.

*EMBO* **22**:6310-6321, 2003

Lambeth J.D.: NOX enzymes and biology of reactive oxygen.

*Nature Rev Immunol* **4**:181-189, 2004

Lassegue B., Sorescu D., Szöcs K., Yin Q., Akers M., Zhang Y., Lambeth D., Griendling K.K.: Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: NOX1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signalling pathways.

*Circ Res* **88**:888-894, 2001

Ledda-Columbano G.M., Molotzu F., Pibiri M., Cossu C., Perra A., Columbano A.: Thyroid hormone induces cyclin D1 nuclear translocation and DNA synthesis in adult rat cardiomyocytes.

*FASEB J* **20**(1):87-94, 2006

Lee T.C., Zhao Y.D., Courtman D.W., Stewart D.J.: Abnormal aortic valve development in mice lacking endothelial nitric oxide synthase.

*Circulation* **101**:2345-2348, 2000

Leu M., Ehler E., Perriard J.-C.: Characterisation of postnatal growth of the murine heart.

*Anat Embryol* **204**:217-224, 2001

Li J.M., Gall N.P., Grieve D.J., Chen M., Shah A.M.: Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure.

*Hypertension* **40**(4):477-484, 2002

Limas C., Bigler A., Bair R., Bernhardt P., Reddy P.: Proliferation activity of urothelial neoplasms: comparison of BrdU incorporation, Ki-67 expression, and nucleolar organiser regions.

*J Clin Pathol* **46**:156-165, 1993

Lin Q., Schwarz J., Bucana C., Olson E.N.: Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor *mef2c*.

*Science* **276**:1404-1407, 1997

Lundberg A.S., Weinberg R.A.: Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes.

*Mol Cell Biol* **18**:753-761, 1998

MacCallum D.E., Hall P.A.: The biochemical characterization of the DNA binding activity of pKi-67.

*J Pathol* **191**:286-298, 2000

Maeda T., Mazzulli J.R., Farrance I.K., Stewart A.F.: Mouse DTEF-1 (ETFR-1, TEF-5) is a transcriptional activator in alpha 1-adrenergic agonist stimulated cardiac myocytes.

*J Biol Chem* **277**(27):24346-24352, 2002

Mansén A., Yu F., Forrest D., Larsson L., Vennstrom B.: TRs have common and isoform-specific functions in regulation of the cardiac myosin heavy chain genes.

*Mol Endocrinol* **15**(12):2106-2114, 2001

Martin G.R.: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.

*Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(12):7634-7638, 1981

Miller R.A., Britigan B.E.: The formation and biologic significance of phagocyte-derived oxidants.

*F Invest Med* **43**:39-49, 1995

Miller-Hance W.C., LaCorbiere M., Fuller S.J., Evans S.M., Lyons G., Schmidt C., Robbins J., Chien K.R.: In vitro chamber specification during embryonic stem cell cardiogenesis. Expression of the ventricular myosin light chain-2 gene is independent of heart tube formation.

*J Biol Chem* **268**(33):25244-25252, 1993

Mohazzab K.M., Kaminski P.M., Wolin M.S.: NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium.

*Am J Physiol* **266**:2568-2572, 1994

Molkentin J.D.: The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression.

*J Biol Chem* **275**(50):38949-38952, 2000

Morin S., Charron F., Robitaille L., Nemer M.: GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters.

*EMBO* 2046-2055, 2000

Müller M., Fleischmann B.K., Selbert S., Ji G.J., Endl E., Middeler G., Müller O.J., Schlenke P., Frese S., Wobus A.M., Hescheler J., Katus H.A., Franz W.M.: Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells in vitro.

*FASEB J* **14**(15):2540-2548, 2000

Müller S., Schönthal A.H., Cadenas E.: Zytostatika lösen die oxidative Bremse im Zellzyklus aus.

*Pharmazeut Z* **18**:11-18, 2000

Nevins J.R.: E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins.

*Science* **258**:424-429, 1992

Neuhaus H., Rosen V., Thies R.S.: Heart specific expression of mouse BMP-10 a novel member of the TGF- $\beta$  superfamily.

*Mech Dev* **80**:181-184, 1999

Nurse P.: Checkpoint pathways come of age.

*Cell* **91**:865-867, 1997

Nurse P.: Cyclin dependent kinases and cell cycle control.

*Chem Bio Chem* **3**:596-603, 2002

O'Donnell B.V., Tew D.G., Jones O.T., England P.J.: Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase.

*Biochem J* **290**:41-49, 1993

Olson T.M., Michels V.V., Thibodeau S.N., Tai Y.-S., Keating M.T.: Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure.

*Science* **280**(5364):750-752, 1998

Pagano M., Theodoras A.M., Tam S.W., Draetta G.F., Chen J.: Cyclin D1-mediated inhibition of repair and replicative DNA synthesis in human fibroblasts.

*Genes Dev* **8**:1627-1639, 1994

Park J.W., Benna J.E., Scott K.E., Christensen B.L., Chanock S.J., Babior B.M.: Isolation of a complex of respiratory burst oxidase components from resting neutrophil cytosol.

*Biochemistry* **33**(10):2907-2911, 1994

Passier R., Mummery C.: Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair.

*Cardiovasc Res* **58**:324-335, 2003

Pasumarthi K.B.S., Nakajima H., Nakajima H.O., Soonpaa M.H., Field L.J.: Targeted expression of Cyclin D2 results in cardiomyocyte DNA synthesis and infarct regression in transgenic mice.

*Circ Res* **96**:110-118, 2005

Pesce M., Gross M.K., Scholer H.R.: In line with our ancestors: Oct-4 and the mammalian germ.

*Bioassays* **20**:722-732, 1998

Peus D., Vasa R. A., Meves A., Beyerle A., Pittelkow M. R.: UVB-induced epidermal growth factor receptor phosphorylation is critical for downstream signaling and keratinocyte survival.

*Photochem Photobiol* **72** (1):135-140, 2000

Quinn M.T., Mullen M.L., Jesaitis A.J., Linner J.G.: Subcellular distribution of the Rap1A protein in human neutrophils: colocalization and cotranslocation with cytochrome b559.

*Blood* **79**(6):1563-1573, 1992

Reecy J.M., Yamada M., Cummings K., Susic D., Chen C.Y., Eichele G., Olson E.N., Schwartz R.J.: Chicken Nkx-2.8: a novel homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and pharyngeal pouch-2 and -3 endoderm.

*Dev Biol* **188**:295-311, 1997

Rehorn K.-P., Thelen H., Michelson A.M., Reuter R.: A molecular aspect of haematopoiesis and endoderm development common to vertebrates and Drosophila.

*Development* **122**:4023-4031, 1996

Reinecke H., Zhang M., Bartosek T., Murry C.E.: Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts - a study in normal and injured rat hearts.

*Circulation* **100**:193-202, 1999

Robertson E., Bradley A., Kuehn M., Evans M.: Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector.

*Nature* **323**:445-448, 1986

Russo A.A., Jeffrey P.D., Patten A.K., Massagué J., Pavletich N.P.: Crystal structure of the p27<sup>KIP1</sup> cyclin-dependant-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex.

*Nature* **382**:325-331, 1996

Sadoshima J., Izumo S.: Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism.

*EMBO* **12**:1681-1692, 1993

Sauer H., Rahimi G., Hescheler J., Wartenberg M.: Effects of electrical fields on cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells.

*J Cell Biochem* **75**:710-723, 1999

Sauer H., Wartenberg M.: Reactive oxygen species as signaling molecules in cardiovascular differentiation of embryonic stem cells and tumor-induced angiogenesis.

*Antioxid Redox Signal* **7**:1423-1434, 2005

Savatier P., Lapillonne H., van Grunsven L.A., Rudkin B.B., Samarut J.: Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D-type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells.

*Oncogene* **12**: 309-322, 1996

Schild D.: Laser scanning microscopy and calcium imaging.

*Cell Calcium* **19**:281-296, 1996

Schmelter M., Ateghang B., Helmig S., Wartenberg M., Sauer H.: Embryonic stem cells utilize reactive oxygen species as transducers of mechanical strain-induced cardiovascular differentiation.

*FASEB J* **20**(8):1182-1184, 2006

Scholzen T., Gerdes J.: The Ki-67 protein: from the known to the unknown.

*J Cell Physiol* **182**:311-322, 2000

Segal B.H., Leto T.L., Gallin J.I., Malech H.L., Holland S.M.: Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease.

*Medicine* **79**(3):170-200, 2000

Sherr, C.J.: Cancer cell cycles.

*Science* **274**:1672-1677, 1996

Sherr, C.J., Roberts, J.M.: CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression.

*Genes Dev.* **13**:1501-1512, 1999

Shiose A., Kuroda J., Tsuruya K., Hirai M., Hirakata H., Naito S., Hattori M., Sakaki Y., Sumimoto H.: A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney.

*J Biol Chem* **276**:1417-1423, 2001

Smith A.: The battlefield of pluripotency.

*Cell* **123**(5):917-29, 2005

Snir M., Kehat I., Gepstein A., Coleman R., Itskovitz-Eldor J., Livne E., Gepstein L.: Assessment of the ultrastructural and proliferative properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes.

*Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**(6):H2355-H2363, 2003

Sorescu D., Weiss D., Lassegue B., Clempus R.E., Szöcs K., Sorescu G.P., Valppu L., Quinn M.T., Lambeth J.D., Vega J.D., Taylor W.R., Griendling K.K.: Superoxide production and expression of NOX family proteins in human atherosclerosis.

*Circulation* **105**:1429-1435, 2002

Sorescu G.P., Song H., Tressel S.L., Hwang J., Dikalov S., Smith D.A., Boyd N.L., Platt M.O., Lassegue B., Griendling K.K., Jo H.: Bone morphogenic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen species production from a NOX1-based NADPH oxidase.

*Circ Res* **95**:773-779, 2004

Stacey D.W.: Cyclin D1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells.

*Current Opinion in Cell Biology* **15**:158-163, 2003

Sugden P.H.: Ras, Akt and mechanotransduction in the cardiac myocyte.

*Circ Res* **93**:1179-1192, 2003

Suh Y.A., Arnold R.S., Lassegue B., Shi J., Xu X., Sorescu D., Chung A.B., Griendling K.K., Lambeth J.D.: Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1.

*Nature* **401**(6748):79-82, 1999



Sundaresan M., Yu Z.-X., Ferrans V., Irani K., Finkel T.: Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction.

*Free Radical Biol Med* **16**:399-403, 1995

Tamamori-Adachi M., Ito H., Sumrejkanchanakij P., Adachi S., Hiroe M., Shimizu M., Kawauchi J., Sunamori M., Marumo F., Kitajima S., Ikeda M.: Cyclin D nuclear import critical for proliferation.

*Circ Res* **92**:e12-e19, 2003

Thannickal V.J., Day R.M., Klinz S.G., Bastien M.C., Larios J.M., Fanburg B.L.: Ras-dependent and -independent regulation of reactive oxygen species by mitogenic growth factors and TGF-beta1.

*FASEB J* **14**(12):1741-1748, 2000

Thannickal V.J., Fanburg B.L.: Activation of an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta 1.

*J Biol Chem* **270**(51):30334-30338, 1995

Tremblay J.J., Viger R.S: GATA factors differentially activate multiple gonadal promoters through conserved GATA regulatory elements.

*Endocrinology* **142**:977-986, 2001

Tyson J., Csikasz-Nagy A., Novak B.: The dynamics of cell cycle regulation.

*BioEssays* **24**:1095-1109, 2002

Ueno H., Perryman M.B., Roberts R., Schneider M.D.: Differentiation of cardiac myocytes after mitogen withdrawal exhibits three sequential states of the ventricular growth response.

*J Cell Biol* **107**:1911-1918, 1988

Vanpoucke G., Goossens S., De Craene B., Gilbert B., van Roy F., Berx G.: GATA-4 and MEF 2C transcription factors control the tissue-specific expression of the  $\alpha$ T-catenin gene CTNNA3.

*Nucleic Acids Research* **32**(14):4155-4165, 2004

van den Worm E., Beukelman C.J., van den Berg A.J., Kroes B.H., Labadie R.P., van Dijk H.: Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils.

*Eur J Pharmacol* **433**(2-3):225-230, 2001

Warnholtz A., Munzel T.: The failing human heart: another battlefield for the NAD(P)H oxidase?

*J Am Coll Cardiol* **41**(12):2172-2174, 2003

Weissmann N., Kuzkaya N., Fuchs B., Tiyerili V., Schäfer R.U., Schütte H., Ghofrani H.A., Schermuly R.T., Schudt C., Sydykov A., Egemnazarow B., Seeger W., Grimminger F.: Detection of reactive oxygen species in isolated, perfused lungs by electron spin resonance spectroscopy.

*Respir Res* **6**(1):86, 2005

Winslow T.: Stem Cells.

*Department of health an human services*, 2001

Wobus A.M., Guan K., Yang H.-T., Boheler K.R.: Embryonic stem cells as a model to study cardiac, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cell differentiation.

*Methods Mol Biol* **185**:127-156, 2002

Woo R.A., Poon R.Y.C.: Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells.

*Cell Cycle* **2**(4):316-324, 2003

Wright G., Singh I., Hasday J., Farrance I., Hall G., Cross A., Rogers T.: Endotoxin stress-response in cardiomyocytes: NF- $\kappa$ B activation and tumor necrosis factor- $\alpha$  expression.

*Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**:H872-H879, 2002

Wu T.W., Hashimoto N., Wu J., Carey D., Li R.K., Mickle D.A., Weisel R.D.: The cytoprotective effect of Trolox demonstrated with three types of human cells.

*Biochem Cell Biol* **68**:1189-1194, 1990

Xia Y., McMillin J.B., Lewis A., Moore M., Zhu W.G., Williams R.S., Kellems R.E.:  
Electrical stimulation of neonatal cardiac myocytes activates the NFAT3 and GATA4  
pathways and up-regulates the adenylosuccinate synthetase 1 gene.

*J Biol Chem* **275**:1855-1863, 2000

Zeller R., Bloch K.D., Williams B.S., Arceci R.J., Seidman C.E.: Localized expression of the  
atrial natriuretic factor gene during cardiac embryogenesis.

*Genes Dev* **1**(7):693-698, 1987

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Sauer des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Humanmedizin, für die Bereitstellung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und seine Geduld in den schwierigeren Phasen während dieser Zeit.

Herrn Prof. Dr. E. Petzinger danke ich für die freundliche Betreuung dieser Arbeit im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, sein Interesse und die hilfreichen Anregungen bei der Erstellung der Promotionsarbeit.

Desweiteren danke ich den Medizinisch-Technischen-Assistenten Barbara Arnold und Sabine Stumpf und allen Mitdoktoranden für ihre Anteilnahme und die moralische Unterstützung in allen Lebenslagen. Sabine Lange und Bernadette Ateghang danke ich besonders für die Unterstützung bei einigen Versuchen und die Korrektur der Arbeit.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern – für alles, was sie bisher und vor allem während des Studiums für mich getan haben.

édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFBENBERGRING 15  
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5138-6

